EVALUIERUNG VERSCHIEDENER VERDÜNNER ZUR FLÜSSIGKONSERVIERUNG VON CANINEM SPERMA

DANIELA KLAUS

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

1. Auflage 2012

1st Edition 2012

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Wehrend

EVALUIERUNG VERSCHIEDENER VERDÜNNER ZUR FLÜSSIGKONSERVIERUNG VON CANINEM SPERMA

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Daniela Klaus
Tierärztin aus Weinheim

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. A. Wehrend

Prof. Dr. M. Bergmann

Tag der Disputation: 06.07.2012

Meinen Eltern

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits in Form von zwei Abstracts auf der „44. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung“, gleichzeitig „36. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung“ vom 16. - 18. Februar 2011 in Hannover
und dem „57. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin (DGK-DVG)“ vom 10. - 13. November 2011 in Berlin publiziert:

Klaus, D., Wehrend, A., Goericke-Pesch, S. (2011)
Comparison of two different extenders for chilling of canine semen
Reprod. Dom. Anim. 46, Suppl. 1, 23 [Abstract]

Goericke-Pesch, S., Klaus, D., Wehrend, A. (2011)
Vergleich zweier verschiedener Verdünner zur Flüssigkonservierung von caninem Sperma
in: Proceedings des 57. Jahreskongresses der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin (DGK-DVG); Berlin, 2011; 368-369 [Abstract]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AI	Artifizielle Insemination
ALH	amplitude of lateral head displacement, engl. für durchschnittliche seitliche Kopfauslenkung der Samenzellen [μm]
AOC	average orientation change (of the head), engl. für durchschnittlicher Richtungswechsel des Spermienkopfes [Grad]
Aqua dest.	Aqua destillata, lat. für destilliertes Wasser
Aqua bidest.	Aqua bidestillata, lat. für bidestilliertes Wasser
AR	Akrosomreaktion
BCF	beat cross frequency, engl. für Anzahl der seitlichen oszillatorischen Bewegungen des Spermienkopfes um die mittlere Bahn [Hz]
BES	N,N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
°C	Grad Celsius
Ca^{2+}	zweifach positiv geladene Calciumionen
Carboxy-SNARF	Carboxy-Seminaphthorhodafluor
CASA	Computer-assisted sperm analysis, engl. für Computer-gestützte Spermienanalyse
CFDA	Carboxyfluoresceindiacetat
CP	Verdünner CaniPRO™ Chill 10
DAP	distance average path, engl. für Durchschnittsstrecke [μm]
DCL	distance curved line, engl. für Kurvenstrecke [μm]
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, engl. für Desoxyribonukleinsäure
DSL	distance straight line, engl. für geradlinige Strecke [μm]
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure / Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii, lat. für und andere
Equex	Equex STM Paste
EthD-1	Ethidiumhomodimer
FITC-PNA	Fluoresceinisothiocyanat Peanut Agglutinin
FITC-PSA	Fluoresceinisothiocyanat Pisum Sativum Agglutinin

g	g-Kraft / g-Beschleunigung
H_2O_2	chemische Summenformel für Wasserstoffperoxid
HCl	chemische Summenformel für Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOS-Test	hypoosmotischer Schwelltest
HTR Ceros 12.1	Hamilton-Thorne sperm analyzer Ceros Version 12.1
HTR IVOS 12.21	Hamilton-Thorne sperm analyzer IVOS Version 12.21
i. d. R.	in der Regel
Kap.	Kapitel
KB	Künstliche Besamung
KGGA	Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen
LDL	Low-density-Lipoprotein
LIN	(VSL/VCL) linearity, engl. für Linearität [%]
Max.	Maximum
Min.	Minimum
Mio.	Millionen
mM	mmol/Liter
Mrd.	Milliarden
n	Anzahl
NFDMS-G-Verdünner	Non Fat Dried Milk Solid-Glucose-Verdünner
Nr.	Nummer
n. s.	nicht signifikant
O_2^-	Hyperoxidanionen (einfach negativ geladene, radikalische Sauerstoffionen)
p	p-value von probability, engl. für Wahrscheinlichkeit; p-Wert (Signifikanzwert)
p_{Verd}	p-Wert für „Haupteffekt Verdünner“
p_{Zeit}	p-Wert für „Haupteffekt Zeit“
p_W	p-Wert für „Wechselwirkung“
PBS	phosphate buffered saline, engl. für phosphatgepufferte Salzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration

PI	Propidiumiodid
pK	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
ROS	reactive oxygen species, engl. für reaktive oxidative Substanzen bzw. reaktive Sauerstoffspezies
SD	standard deviation, engl. für Standardabweichung
SDS	sodiumdodecyl(lauryl)sulfate, engl. für Natriumdodecyl(lauryl)sulfat
SF	Streufaktor
SGZ	Spermiengesamtzahl
STR	(VSL/VAP) straightness, engl. für Geradlinigkeit [%]
Tab.	Tabelle
TALP	Tyrode's Albumin Lactat Pyruvat
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure
TG-Sperma	Tiefgefriersperma
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TE	TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner
Up 1	Uppsala Equex-2 System (nur Verdünner 1)
Up 1 + 2	Uppsala Equex-2 System (Verdünner 1 und Verdünner 2)
VAP	velocity average path(way), engl. für mittlere Geschwindigkeit (Geschwindigkeit über die gemittelte Bahn) [µm/sec]
VCL	velocity curved line (velocity curvilinear), engl. für kurvilineare Geschwindigkeit (Geschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn) [µm/sec]
% Vol.	Volumenprozent
VSL	velocity straight line, engl. für lineare Geschwindigkeit (Geschwindigkeit über eine gerade Linie vom Anfang zum Ende) [µm/sec]
WOB	(VAP/VCL) wobble, engl. für Schwankung (der kurvilinearen Strecke um die mittlere Strecke) [%]
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
$\bar{x}_g$	geometrischer Mittelwert
$\bar{x}_r$	„modifizierter Mittelwert“ (rücktransformierter Mittelwert)
ZP	Zona pellucida

1 Einleitung und Fragestellung

Nachdem die künstliche Besamung bei vielen Nutztierarten bereits seit langer Zeit ein wichtiges Zuchtinstrument darstellt, gewinnt sie auch in der Hundezucht immer mehr an Bedeutung. Bei Verwendung von Sperma guter Qualität und einem optimalen Besamungsregime können mit der künstlichen Besamung Trächtigkeitsergebnisse und Wurfgrößen erzielt werden, die denen eines natürlichen Deckaktes entsprechen. Dabei haben insbesondere die Wahl des geeigneten Besamungszeitpunktes sowie die korrekte Deponierung des Spermas im weiblichen Genitale einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg dieser Reproduktionstechnik. Neben Frischsperma kommen bei der künstlichen Besamung flüssigkonserviertes Sperma sowie Tiefgefriersperma zum Einsatz, wobei mit flüssigkonserviertem Sperma deutlich bessere Konzeptionsraten und höhere Wurfgrößen erreicht werden können als mit kryokonserviertem Sperma. Daher ist in der klinischen Praxis die Nachfrage nach flüssigkonserviertem Hundesperma steigend, zudem im Vergleich mit tiefgefrorenem Sperma auch die Herstellung und der Versand von flüssigkonserviertem Sperma einfacher und kostengünstiger sind. Problematisch bei der Flüssigkonservierung ist allerdings die begrenzte Überlebensdauer der Samenzellen, welche eine gutes Zeitmanagement hinsichtlich Samengewinnung und Besamungszeitpunkt erfordert. Ungeklärt ist dabei, wie lange die Befruchtungsfähigkeit der flüssigkonservierten Spermien konkret aufrechterhalten werden kann.

In bisherigen Untersuchungen zur Konservierung von caninem Sperma wurden hauptsächlich Verdünner für die Kryokonservierung getestet. In den weniger zahlreichen Arbeiten, die sich mit Verdünnern für die Flüssigkonservierung beschäftigen, wurde die Spermaqualität zum Teil nur über einen Zeitraum von wenigen Tagen untersucht, da generell davon ausgegangen wurde, dass die Fertilität des Spermas nur für eine relativ kurze Zeitspanne aufrechterhalten werden kann. Es wurden jedoch auch Studien durchgeführt, die längere Untersuchungszeiträume aufwiesen und somit darauf hindeuten, dass die Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen über eine längere Zeitspanne konserviert werden kann. Des Weiteren wurden Versuche unternommen, die Lebensspanne der Spermien durch den Zusatz verschiedener Antioxidantien oder anderer Stoffe bzw. durch das Auswechseln des Verdünners zu verlängern.

Für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma bei 4°C wird eine Vielzahl verschiedener Verdünner eingesetzt. Dabei können grundsätzlich kommerzielle und nichtkommerzielle, d. h. selbst im Labor hergestellte, Verdünner unterschieden werden. In beiden Gruppen handelt es sich meist um TRIS- oder milchbasierte Verdünner.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Splitsample-Verfahren drei verschiedene Verdünner für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma bei 4°C vergleichend untersucht. Dabei handelte es sich um den kommerziellen Verdünner CaniPRO™ Chill 10 (Minitüb GmbH, Tiefenbach) und zwei nichtkommerzielle Verdünner (TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner und Uppsala Equex-2 System). Diese Verdünner wurden ausgewählt, da sie kommerziell erworben werden können bzw. einfach herzustellen sind und deshalb in der klinischen Praxis weitverbreitet eingesetzt werden. Das Uppsala Equex-2 System, bei dem es sich eigentlich um einen gebräuchlichen Verdünner für die Kryokonservierung von Hundesperma handelt, wurde in diese Arbeit mit aufgenommen, da es bei der Kryokonservierung gute Auftauergebnisse liefert und geprüft werden sollte, inwieweit dies auch für die Flüssigkonservierung zutrifft.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war somit zum einen die Klärung der Frage, welcher der drei genannten Verdünner am besten zur Flüssigkonservierung von caninem Sperma bei 4°C geeignet ist und zum anderen, wie lange eine akzeptable Spermaqualität in den flüssigkonservierten Ejakulaten aufrechterhalten werden kann. Als Beurteilungsparameter wurden dazu verschiedene Spermaparameter, welche über einen Zeitraum von zehn Tagen für drei Tage im 24-Stunden-Rhythmus und anschließend im 48- bzw. 72-Stunden-Rhythmus vergleichend untersucht wurden, herangezogen. Hierbei kamen sowohl die Methoden der klassischen Spermatologie als auch die Computer-gestützte Spermienanalyse (System SpermVision™ der Minitüb GmbH, Tiefenbach) zur Anwendung. Daher bestand ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit darin, zu überprüfen, ob mit beiden Untersuchungsmethoden gleichwertige Ergebnisse erzielt werden können.

2 Literatur

2.1 Bedeutung der künstlichen Besamung für die Hundezucht

Die künstliche Besamung (KB) oder artifizielle Insemination (AI) stellt die Einführung von Sperma in den weiblichen Reproduktionstrakt ohne das Stattfinden eines natürlichen Deckaktes dar (England und Millar, 2008). Sie kann intravaginal, intrauterin oder intratubal mit frischem, flüssigkonserviertem oder tiefgefrorenem Sperma durchgeführt werden (Pinto et al., 1999; Farstad, 2000; England und Millar, 2008; Thomassen und Farstad, 2009).
Der erste wissenschaftliche Bericht über eine erfolgreiche KB beim Säugetier stammt aus Italien aus dem Jahr 1780 und beschreibt die AI einer Barbet-Hündin durch Abbé Spallanzani, die nach einer Trächtigkeitsdauer von 62 Tagen zur Geburt von drei Welpen führte (Heape, 1897). Diese KB war jedoch eher experimenteller Natur und erst seit 1940 wird diese Reproduktionstechnik beim Hund angewendet, um Anpaarungen zu erreichen, die auf natürliche Weise unmöglich gewesen wären (Harrop, 1956). Die erste Beschreibung einer erfolgreichen KB mit flüssigkonserviertem Sperma beim Hund stammt aus dem Jahr 1954 (Harrop, 1954), mit Tiefgefriersperma (TG-Sperma) aus dem Jahr 1969 (Seager, 1969).
Während die KB bei einigen Haustierspezies, insbesondere Rind und Schwein, seit langer Zeit ein wichtiges Instrument der modernen Tierzucht darstellt (Andersen, 1980), kam der Durchbruch dieser Reproduktionstechnologie beim Hund erst in den letzten 20 Jahren, was auch an der Anzahl der Publikationen und Inseminationen deutlich wird (Linde-Forsberg, 1991; Farstad, 2000; Wilson, 2001; Peña et al., 2006; England und Millar, 2008). Während die Nachfrage für Reproduktionstechnologien generell signifikant gestiegen ist (Peña et al., 2006), gibt es dennoch nationale Unterschiede in den ethischen und gesetzlichen Rahmenbedingungen, die den Einsatz der KB beim Hund regeln (Pesch et al., 2007; England und Millar, 2008).

2.1.1 Vor- und Nachteile

Als Vorteile der KB können folgende Aspekte angesehen werden:

- Zuchtnutzung von Rüden oder Hündinnen, die aus physischen Gründen (anatomische Abweichungen oder pathologische Zustände) nicht natürlich miteinander verpaart werden können (Harrop, 1956; Kibble, 1969; Christiansen, 1984a; Silva et al., 1996; England und Millar, 2008)
- Möglichkeit zur Kreuzung von Tieren, die auf natürliche Weise aufgrund von Größenunterschieden nicht ohne Schwierigkeiten miteinander verpaart werden könnten (Heape, 1897; Kibble, 1969) bzw. von Tieren mit leicht unterschiedlicher Saisonalität (Thomassen und Farstad, 2009)
- Zuchtnutzung von Tieren, die aus verhaltensbedingten Gründen nicht zur Zucht eingesetzt werden können (Kibble, 1969; England und Millar, 2008)
- Möglichkeit der Aufteilung eines Ejakulates, sodass mehrere Hündinnen (1-5) mit dem Ejakulat eines Rüden besamt werden können (Heape, 1897; Rota et al., 1999a; England und Millar, 2008; Thomassen und Farstad, 2009)
- hocheffiziente Vereinfachung des genetischen Fortschritts (England und Millar, 2008)
- günstige und schnelle Zuchtmethode (England und Millar, 2008)
- Erhöhung der Zuchthygiene (Thomassen und Farstad, 2009) und Kontrolle einiger infektiöser Krankheiten durch die Vermeidung des physischen Kontaktes zwischen den Tieren bzw. durch die Möglichkeit zur Behandlung des Spermas vor der Insemination (Harrop, 1956; Seager und Platz, 1977a; Christiansen, 1984a; Silva et al., 1996; England und Millar, 2008)
- Möglichkeit zur Untersuchung der Spermaqualität vor der Besamung und somit, falls nötig, die Auswahl eines alternativen Zuchtrüden (England und Millar, 2008)
- Verhinderung von Inzucht in kleinen Populationen (England und Millar, 2008)
- Steigerung und Ausweitung der Zuchtnutzung bewährt wertvoller Vatertiere (Harrop, 1956; Seager und Platz, 1977a; Christiansen, 1984a)

In Kombination mit der Spermakonservierung ergeben sich weitere Vorteile:

- durch Kryokonservierung die Möglichkeit zur Konservierung und Lagerung wertvoller Gene männlicher Tiere für nahezu unendliche Zeit (England und Millar, 2008)
- Möglichkeit zur Zuchtnutzung eines Rüden über dessen Tod hinaus (Christiansen, 1984a; Kutzler, 2005; England und Millar, 2008)

- Möglichkeit zum Transport von Sperma, sodass genetisches Material auch außerhalb einer Zuchtkolonie verfügbar ist (England und Millar, 2008) bzw. sodass geographische Barrieren kein Hindernis mehr darstellen (Harrop, 1956; Kibble, 1969; Günzel, 1986; Pinto et al., 1999)
- Möglichkeit zur Überwindung von Quarantänerestriktionen (Christiansen, 1984a; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989; England und Millar, 2008)
- der Transport von Tieren wird unnötig, wodurch Transportstress, Krankheitsrisiken (Linde-Forsberg und Forsberg, 1989; Silva et al., 1996; England und Millar, 2008) und Transportkosten (Seager und Platz, 1977a; Kutzler, 2005) reduziert bzw. eliminiert werden
- Etablierung von Samenbanken, die einen genetischen Pool anbieten, der für geographisch isolierte, kleine Populationen von Hunden genutzt werden kann, um Inzucht zu vermeiden, und der bei der Eliminierung von Erbkrankheiten hilft (Morton und Bruce, 1989) bzw. der eine Erhaltung des genetischen Potenzials von gefährdeten Rassen sichert (Thomassen und Farstad, 2009)
- den Züchtern von Diensthunden, wie Sprengstoffspür-, Drogenspür- und Blindenbegleithunden etc., ermöglicht die Kryokonservierung von Sperma die Kastration der männlichen Tiere in einem frühen Alter, während die Verfügbarkeit ihrer Gene erhalten bleibt, bis ihre Leistung getestet wurde (England und Millar, 2008)
- Möglichkeit zur Bergung genetischen Materials vor einer medizinischen Behandlung bei einem kranken männlichen Tier (Thomassen und Farstad, 2009)
- die Notwendigkeit, Rüden in Zuchtzwingern zu halten, wird reduziert, wodurch Kosten gesenkt werden können (England und Millar, 2008)

Trotz der vielen Vorteile gibt es jedoch auch einige mögliche Nachteile der KB. Dazu zählen folgende Punkte:

- Verursachen eines physischen oder psychischen Traumas während der Durchführung der KB (England und Millar, 2008)
- Ausführung einer KB aus unangemessenen Gründen (z. B. wenn der Zuchtausschluss eines Tieres aufgrund einer erblichen Krankheit, wie Hüftgelenksdysplasie oder anatomischer Anomalität des Reproduktionstraktes, erfolgte) (England und Millar, 2008)

- potenzielle Einschleppung von Erbkrankheiten oder Anomalien in die Population (England und Millar, 2008)
- mögliche Überbeanspruchung einzelner Rüden in einem Zuchtprogramm oder innerhalb einer bestimmten Rasse (England und Millar, 2008)
- Möglichkeit der Verwechslung der Abstammung (England und Millar, 2008)

2.1.2 Technik der Samenübertragung

Für die erfolgreiche Anwendung der KB ist es wichtig, diese zum optimalen Zeitpunkt durchzuführen, Sperma guter Qualität zu verwenden und dieses an der idealen Stelle für die Befruchtung zu deponieren (Linde-Forsberg, 1991; Thomassen und Farstad, 2009).

Zur Bestimmung des optimalen Besamungszeitpunktes kommen mehrere Verfahren in Betracht, wobei die Messung der Serum-Progesteronkonzentration und die Vaginalzytologie die relevantesten sind (Morton und Bruce, 1989; Peña et al., 2006).

Der Reproduktionstrakt der Hündin weist im Vergleich zu anderen Haustierspezies einige Besonderheiten auf, deren ausführliche Darstellung bei Wilson (2001) zu finden ist. Zusammenfassend gestaltet sich die Katheterisierung der Zervix beim Hund durch die lange Vagina, den aufgrund der dorsomedialen Falte engen parazervikalen Raum, die Position des externen Ostiums und die Winkelung sowie den schmalen Durchmesser des Zervikalkanals als relativ schwierig (Wilson, 2001).

Es gibt verschiedene Techniken für die künstliche Samenübertragung beim Hund, wobei das Sperma entweder tief intravaginal oder intrauterin deponiert wird. Bei der intrauterinen Samendeponierung sind die transzervikale-intrauterine Besamung mithilfe eines starren Katheters („Norwegischer Katheter“) bei transabdominaler Fixation der Zervix, die transzervikale-intrauterine endoskopische Besamung sowie die chirurgische intrauterine Besamung zu unterscheiden (Pesch et al., 2007). Ferner besteht im Rahmen der chirurgischen Besamung die Möglichkeit, das Sperma direkt in die Eileiterampullen einzubringen, was als intratubale Besamung bezeichnet wird (Tsutsui et al., 2003a).

Bei der intravaginalen Besamung wird das Sperma mit einem Uterus-Einweg-Plastikkatheter für Rinder (Seager und Fletcher, 1972), dem Norwegischen

Katheter (Farstad, 1984) oder dem sog. Osiris-Katheter (Theret et al., 1987) in die kraniale Vagina eingebracht (Seager und Fletcher, 1972; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989). Das Anheben des Hinterteils der Hündin während der Samendeponierung und für die darauffolgenden zwei bis zehn Minuten in einem Winkel von 60-80° verhindert einen Rückfluss des Spermas (Seager und Fletcher, 1972; 1973; Seager und Platz, 1977a; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989), wobei aber auch ein kürzeres Hochhalten nicht zu einer Verschlechterung der Konzeptionsraten führt (Pinto et al., 1998).
Die intravaginale Technik ist nichtinvasiv, einfach durchzuführen (Silva et al., 1996) und bei Verwendung von nativem bzw. flüssigkonserviertem Sperma, jedoch nicht bei TG-Sperma, geeignet, gute Trächtigkeitsergebnisse zu erzielen (England und Millar, 2008; Thomassen und Farstad, 2009).

Die Technik der transzervikalen-intrauterinen Besamung mit transabdominaler Fixation der Zervix, oft als Norwegische oder Skandinavische Methode bezeichnet (Thomassen et al., 2001), wurde ursprünglich für die Besamung des Blaufuchses entwickelt (Fougner et al., 1973) und beim Hund erstmals von Andersen (1975) beschrieben. Der Metallkatheter („Norwegischer Katheter“) (Andersen, 1975), welcher in drei Größen (Längen von 20 bis 50 cm) verfügbar ist (Linde-Forsberg, 1991), wird an der stehenden Hündin unter manueller Kontrolle durch das externe Ostium zur Samendeponierung in den Uteruskörper vorgeschoben (Andersen, 1975; Günzel, 1986; Linde-Forsberg, 1991). Das Hochhalten des Hinterteils der Hündin ist auch hier im Anschluss üblich (Linde-Forsberg, 1991).
Mit einiger Übung kann diese Technik bei den meisten Hündinnen schnell, einfach und ohne Sedation durchgeführt werden (Linde-Forsberg et al., 1999; Thomassen und Farstad, 2009). Bei nervösen oder adipösen Tieren ist diese Methode allerdings unpraktisch, da die Manipulation der Zervix durch das Abdomen schwierig oder gar unmöglich sein kann (Silva et al., 1995).

Bei der transzervikalen-intrauterinen endoskopischen Besamung, welche auch als Neuseeländische endoskopische Methode bezeichnet wird (Wilson, 2001), handelt es sich um eine Weiterentwicklung der vorgenannten Methode durch Wilson (1993). Die Ausrüstung besteht aus einem starren Zystourethroskop mit einer 30° Winkeloptik, einem Adapter mit Arbeitskanal, durch welchen der Katheter geführt wird, einer Kaltlichtquelle und optional einem Monitor. Für das Einbringen des Spermas wird ein feiner semiflexibler Harnkatheter aus Kunststoff verwendet

(Wilson, 2001). Das Endoskop wird an der stehenden Hündin in die Vagina eingeführt und unter Sichtkontrolle bis zum externen Ostium vorgeschoben. Dann wird der Katheter in die Öffnung eingeführt und unter ständigen Drehbewegungen durch den Zervikalkanal bis in den Uterus vorwärts bewegt, wo schließlich das Sperma deponiert wird (Wilson, 2001).
Vorteile dieser Methode sind insbesondere die Visualisierung, aber auch die Möglichkeit zur intrauterinen Untersuchung und Probenentnahme (Wilson, 2001; Thomassen und Farstad, 2009). Auch die Anwendung dieser Technik ist nach einiger Übung bei Hündinnen in Standhitze i. d. R. ohne Sedierung möglich (Wilson, 2001). Nachteilig sind vor allem die hohen Anschaffungskosten für das Equipment. Wie einfach das externe Ostium einer Hündin zu katheterisieren ist, hängt von der Länge der Vagina, der Weite des parazervikalen Bereiches und der Lage der externen Zervikalöffnung ab (Wilson, 1993; 2001).

Bei der chirurgischen Besamung lassen sich die laparoskopische und die laparotomische intrauterine Besamung unterscheiden.
Die Technik der laparoskopischen intrauterinen Besamung wurde beim Hund erstmals von Silva et al. (1995) beschrieben. Das genutzte Laparoskop hat einen Durchmesser von 8 mm, besteht aus einer 0° Winkeloptik und ist mit einer elektrischen Lichtquelle sowie einer Kamera verbunden. Das Sperma wird bei dieser Methode mittels eines Katheters, der proximal der Bifurkation in Richtung des Ovars eingeführt wird, in den Uterus eingebracht (Silva et al., 1995). Diese Technik ist im Vergleich zur laparotomischen intrauterinen Besamung weniger traumatisierend, hat ein geringeres Infektionsrisiko, da die Bauchhöhle nicht vollständig geöffnet wird, und ermöglicht eine schnellere Erholung der Patienten (Silva et al., 1995).
Bei der laparotomischen intrauterinen Besamung wird das Sperma nach Inzision des Uteruskörpers über einen Katheter in Richtung des Ovars im Uteruslumen deponiert (Brittain et al., 1995).
Die Methoden der chirurgischen Besamung sind invasiv und verlangen eine Allgemeinanästhesie der Hündin, weswegen sie häufig kontrovers diskutiert werden. In einigen Ländern, vor allem in den USA (Farstad, 2000; Thomassen und Farstad, 2009), werden sie jedoch trotzdem weitläufig eingesetzt, wohingegen sie in anderen Ländern, wie z. B. Schweden und Niederlande, verboten sind (England und Millar, 2008). Nachteilig bei diesen Methoden sind das damit verbundene

Narkose- und Operationsrisiko sowie die Tatsache, dass nur eine einmalige Besamung realistisch und ethisch vertretbar ist (Wilson, 2001).

2.1.3 Besamungsdosis

Gill et al. (1970) sehen bei Verwendung von nativem, von frisch-verdünntem und von verdünntem, gelagertem Sperma zur intrauterinen Besamung eine Besamungsdosis von 200 Mio. Spermien pro Insemination als geeignet an, während hingegen bei 50 Mio. Spermien die Konzeptionsraten signifikant niedriger sind (20 % versus 80 %). Bei Verwendung von TG-Sperma zur intrauterinen Besamung empfehlen Andersen (1975), Farstad und Andersen Berg (1989) und Rota et al. (1999a) eine Gesamtzahl von 150-200 $x 10^6$ Spermien pro Besamungsdosis, um eine Konzeption und normale Wurfgrößen zu erzielen, den optimalen Zeitpunkt für die Besamung vorausgesetzt. Rijsselaere et al. (2002a) inseminieren bei Nutzung von frischem, gekühltem Samen ein Minimum von 150 $x 10^6$ motilen Spermien und empfehlen bei Verwendung von gefrorenem Sperma sogar eine Gesamtzahl von 300 $x 10^6$ Spermien.

Generell wird empfohlen, mindestens 150-200 Mio. motile und morphologisch normale Samenzellen pro Insemination zu verwenden (Linde-Forsberg, 2001; Peña et al., 2006); eine zweimalige KB erscheint sinnvoll (Linde-Forsberg, 2001). Eine unterdurchschnittliche Spermaqualität sollte durch eine Erhöhung der Spermienanzahl pro Besamungsdosis kompensiert werden (Linde-Forsberg, 2001).

Das finale Inseminationsvolumen sollte, abhängig von der jeweiligen Rasse und Größe der Hündin, bei intrauterinen Besamungen eine Menge von 1-3 ml (Linde-Forsberg, 2005) bzw. 2 ml (Cain, 2001; Pesch et al., 2007) und bei intravaginalen Besamungen eine Menge von 3-5 ml (Soderberg, 1986; Linde-Forsberg, 2005) nicht überschreiten, da das Uteruslumen bei der Hündin klein ist (Linde-Forsberg, 1991; 1995; 2005) und größere Volumina zu einem Verlust von Spermien aufgrund des Rückflusses aus Uterus oder Vagina führen (Linde-Forsberg, 2001). Entsprechend der Größe der Hündin sollte jedoch ein Volumen von 2-4 ml auch nicht unterschritten werden (Peña et al., 2006).

2.1.4 Erfolgsraten

Der Erfolg der KB bei der Hündin ist von zahlreichen Faktoren abhängig. So haben der Zeitpunkt der Besamung, die Qualität des inseminierten Spermas, der

Ort der Samendeponierung, die Anzahl der Besamungen, die Fertilität von Hündin und Rüde sowie die verwendete Besamungsdosis einen Einfluss auf die erzielten Konzeptionsraten (Wilson, 1993; England und Millar, 2008).
Insbesondere bei Verwendung von TG-Sperma ist die Wahl des korrekten Besamungszeitpunktes von entscheidender Bedeutung, was wahrscheinlich auf die reduzierte Überlebensdauer von kryokonservierten Spermien zurückzuführen ist (Farstad und Andersen Berg, 1989). Bei Raumtemperatur konnte für aufgetaute Spermien eine Überlebensdauer von sechs bis sieben Stunden ermittelt werden; allerdings ist in vivo von einer längeren Lebensspanne auszugehen (Seager und Fletcher, 1973). Frische Spermien haben im Uterus der Hündin hingegen eine Lebensdauer von mindestens vier bis sechs Tagen (Doak et al., 1967).
Die intrauterine KB führt zu deutlich besseren Konzeptionsraten als die intravaginale Insemination (Fontbonne und Badinand, 1993; Linde-Forsberg et al., 1999). Unabhängig von der Inseminationstechnik verbessert sich die Konzeptionsrate mit steigender Anzahl an Besamungen (Günzel, 1986; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989; 1993; Thomassen et al., 2001), sodass Günzel (1986) eine zweimalige Besamung im Abstand von 48 Stunden bei Verwendung von Frischsperma bzw. im Abstand von 24 Stunden bei flüssig- oder kryokonserviertem Sperma empfiehlt. Bei zweimaliger Insemination am optimalen Besamungszeitpunkt unterscheiden sich die Konzeptionsraten nicht signifikant (79,3% versus 76,8%); allerdings ist die Wurfgröße bei zweimaliger Besamung höher (Thomassen et al., 2006).
Die Erfolgsquoten der KB beim Einsatz von frischem oder flüssigkonserviertem Sperma können denen eines natürlichen Deckaktes entsprechen (Pinto et al., 1999), was auch aus der nachfolgenden tabellarischen Übersicht der Konzeptionsraten ersichtlich wird (Tab. 1). Zudem ist erkennbar, dass mit flüssigkonserviertem Sperma auch bei vaginaler Deponierung des Samens die Trächtigkeitsraten akzeptabel bleiben (Rota et al., 1995).
Wichtig ist, bei der Interpretation der Daten zu beachten, dass es zwischen den einzelnen Studien signifikante Unterschiede bezüglich der eingesetzten Samenübertragungstechnik, der verwendeten Besamungsdosis sowie der Häufigkeit der Inseminationen gibt (Silva et al., 1996; England und Millar, 2008) und in vielen Arbeiten nur eine geringe Anzahl an Hündinnen verwendet wurde (England und Millar, 2008).

Tab. 1: Vergleichende Darstellung der Konzeptionsraten und der durchschnittlichen Wurfgrößen bei natürlicher Paarung, künstlicher Besamung (KB) mit Frischsperma, KB mit flüssigkonserviertem Sperma und KB mit Tiefgefriersperma (TG-Sperma)

	Konzeptionsraten	Durchschnittliche Wurfgrößen	Quellen
Natürliche Paarung	78,3 % bis 92 %	4,9 bis 6,9	Gill et al., 1970; Seager et al., 1975; Farstad, 1984; Tsutsui et al., 2003b
KB mit Frischsperma			
- intravaginal	25 % bis 94 %	5,0 bis 7,2 ± 0,5	Seager und Fletcher, 1972; Seager et al., 1975; Farstad, 1984; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989; 1993; Mickelsen et al., 1993; Pinto et al., 1999; Niżański, 2006
- intrauterin	70 % bis 100 %	5,1 bis 5,6	Gill et al., 1970; Farstad, 1984; Silva et al., 1996
KB mit flüssig-konserviertem Sperma (24 h)			
- intravaginal	53 % bis 90 %	3,4 ± 0,6 bis 7,2 ± 0,6	Seager und Fletcher, 1972; Goodman und Cain, 1993; Linde-Forsberg und Forsberg, 1993; Pinto et al., 1999; Tsutsui et al., 2003b
- intrauterin	80 % (Wurfrate)	4,2	Gill et al., 1970
KB mit TG-Sperma			
- intravaginal	10 % bis 65,8 %	3,9 ± 1,2 bis 6,0	Seager et al., 1975; Fontbonne und Badinand, 1993; Silva et al., 1996; Linde-Forsberg et al., 1999; Thomassen et al., 2001; 2006; Niżański, 2006
- intrauterin	51,1 % bis 89,4%	4,1 ± 2,4 bis 6,9 ± 2,7	Farstad, 1984; Farstad und Andersen Berg, 1989; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989; 1993; Fontbonne und Badinand, 1993; Wilson, 1993; Silva et al., 1996; Linde-Forsberg et al., 1999; Thomassen et al., 2001; 2006; Pretzer et al., 2006

2.2 Gewinnung des Ejakulates

2.2.1 Indikationen für die Spermagewinnung

Die Spermagewinnung beim Hund kann aus verschiedenen Indikationen erfolgen: 1) zur Verwendung für die KB oder zur Herstellung von konserviertem Sperma, 2) im Rahmen von Zuchttauglichkeitsuntersuchungen oder 3) als Untersuchungsgrundlage für diagnostische Zwecke aufgrund von andrologischen Erkrankungen (Johnston, 1991; Kutzler, 2005). Die Spermagewinnung im Rahmen einer andrologischen Untersuchung dient dabei sowohl zur Beurteilung der Potentia coeundi (Begattungsfähigkeit) als auch der Gewinnung eines vollständigen Ejakulates, das als Beurteilungsgrundlage für die Potentia generandi (Befruchtungsfähigkeit) genutzt wird (Günzel, 1986).

2.2.2 Voraussetzungen und Methoden

Die Spermagewinnung sollte in ungestörter Umgebung, ggf. ohne weißen Kittel, mit einer minimalen Anzahl an Personen und unter ruhiger Handhabung der Tiere weitgehend ohne Zwangsmaßnahmen stattfinden (Macpherson und Penner, 1967; Seager und Platz, 1977b; Christiansen, 1984b; Günzel, 1986; Linde-Forsberg, 1991; Kutzler, 2005).

Die Anwesenheit einer läufigen Hündin während der Spermagewinnung ist nicht erforderlich, verbessert aber die Erfolgschancen (Seager und Platz, 1977b; Günzel, 1986) vor allem bei nervösen oder unerfahrenen Rüden (Kutzler, 2005) und führt zu einer Verbesserung der Qualität (Seager und Platz, 1977b; Peña et al., 2006), insbesondere der Spermiengesamtzahl (SGZ) im Ejakulat (Boucher et al., 1958). Die verwendete Hündin muss sich nicht zwangsläufig im Östrus befinden. Auch die Anwesenheit einer unterwürfigen Hündin in einem beliebigen Zyklusstadium oder sogar die eines kastrierten Rüden kann nützlich sein (Kutzler, 2005). Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Hündin mit synthetischen Pheromonen (Methyl-p-hydroxybenzoat; Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, USA) zu präparieren oder Vaginalsekret von gesunden, Brucella-negativen östrischen Hündinnen aus früheren Untersuchungen auf Gazetupfern aufzufangen und in einem handelsüblichen Gefrierschrank bei - 20°C für den zukünftigen Gebrauch aufzubewahren (Kutzler, 2005). Im Idealfall sollte die verwendete Hündin annähernd die Größe des Rüden besitzen (Freshman, 2002).

Hinsichtlich der Absamungsfrequenz empfehlen Boucher et al. (1958) und Christiansen (1984b) eine Spermagewinnung maximal jeden zweiten Tag, Olar et al. (1983) sogar nur alle vier bis fünf Tage, da bei einer höheren Frequenz durch eine Depletion der epididymalen Spermareserven die SGZ im Ejakulat vermindert sein kann (Boucher et al., 1958). Allerdings kann zur Vermehrung der Spermaausbeute an einem bestimmten Tag um bis zu 70 % eine zweite Absamung vorgenommen werden, wobei nur Volumen, Konzentration und SGZ geringere Werte zeigen, während Motilität und Morphologie der Samenzellen unbeeinflusst bleiben (England, 1999).

Nach Fielden (1971), Christiansen (1984b) und Günzel (1986) sind die drei wichtigsten Methoden zur Spermagewinnung beim Hund die digitale Manipulation (manuelle Penismassage; siehe unten), die künstliche Vagina (Macpherson und Penner, 1967; Fielden, 1971; Christiansen, 1984b; Johnston, 1991; Yamashiro et al., 2007) und die Elektroejakulation (Macpherson und Penner, 1967; Seager und Platz, 1977b; Christiansen, 1984b; Ohl et al., 1994; Pesch et al., 2007; Thomassen und Farstad, 2009). Eine weitere Alternative ist die Nutzung pharmakologischer Methoden (Kutzler, 2005). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, Samenzellen direkt aus dem Epididymis zu gewinnen, was sowohl intra-vitam nach Kastration als auch post-mortem erfolgen kann (Thomassen und Farstad, 2009).

Die manuelle Stimulation ist die gebräuchlichste Methode der Spermagewinnung beim Hund (Kutzler, 2005). Es werden ausschließlich vorgewärmte, graduierte Glas- oder vorzugsweise Plastikgefäße mit einer weiten Öffnung und einem verjüngten Ende benötigt (Seager und Fletcher, 1972; Günzel, 1986; Linde-Forsberg, 1991; Freshman, 2002). Vor der Absamung sollte zur Entfernung von Präputialkatarrh die Präputialöffnung mit Zellstoff trocken gereinigt werden (Hoffmann, 2003a). Die Spermagewinnung sollte mit behandschuhten Händen durchgeführt werden (Seager und Fletcher, 1972; Linde-Forsberg, 1991), wobei anstatt von Latex- aufgrund des nachteiligen Effektes auf die Spermienmotilität besser Vinylhandschuhe verwendet werden (Althouse et al., 1991).
Zunächst wird der Penis im Bereich des Bulbus glandis (Bulbusschwellkörper) durch das Präputium hindurch kräftig massiert, bis es zu einer partiellen Erektion, dem sogenannten Aufknoten des Bulbus, kommt. Nun wird das Präputium zügig hinter den Bulbus verlagert und weiterhin ein konstanter, fester Druck auf den

Penis ausgeübt, indem dieser hinter dem Bulbus zwischen Zeigefinger und Daumen ringförmig umschlossen wird. Sofort nach Beginn des Ausübens von Druck an dieser Stelle setzt die Ejakulation ein. Während der darauffolgenden Entwicklung einer vollständigen Erektion können minimale bis starke Friktionsbewegungen auftreten. Wenn der Hund versucht umzusteigen, indem er sein Bein über den Arm des Untersuchers hebt, kann der Penis um 180° nach kaudal abgelenkt werden (Kutzler, 2005). Auf diese Weise wird das Hängen imitiert (Hoffmann, 2003a). Das Ende der Ejakulation wird durch das plötzliche Erschlaffen des Penis angekündigt, woraufhin dessen Fixation gelöst wird. Allerdings kann die Reflexkette auch schon vorzeitig durch Lösen der Fixation des Penis abgebrochen werden (Hoffmann, 2003a).
Nach der Samengewinnung sollte der Hund nicht unbeaufsichtigt gelassen werden bis die Erektion vollständig zurückgegangen ist und sich der Penis wieder komplett in der Präputialhöhle befindet (Johnston, 1991). Zur Infektionsprophylaxe kann zuvor noch eine geeignete keimhemmende Salbe (z. B. Akridinsalbe) auf die Penisschleimhaut aufgetragen werden (Pesch et al., 2007). Kutzler (2005) empfiehlt das Auftragen eines nichtspermiziden, wasserlöslichen Gleitgels auf die Penisschleimhaut, insbesondere im Bereich hinter dem Bulbus glandis, um einer Inversion des Präputiums vorzubeugen.
Die manuelle Stimulation induziert sowohl die Paarungsreflexe als auch einen geordneten Ejakulationsablauf (Günzel, 1986). Die einzelnen Fraktionen können hierbei durch Auswechseln der Samenauffanggläser bei makroskopisch sichtbarer Konsistenz- und Farbänderung des Sekrets einfach und präzise getrennt werden (Christiansen, 1984b; Günzel, 1986).

Das Ejakulat des Hundes besteht aus drei Fraktionen: Erste (spermienarme) Fraktion, zweite (spermienreiche) Fraktion und dritte Fraktion (Prostatasekret) (Seager und Platz, 1977b; Christiansen, 1984b; Kutzler, 2005). Die erste Fraktion ist wässrig, stammt von der Prostata und hat i. d. R. ein Volumen von 1-5 ml. Ihre Abgabe dauert etwa 0,5 bis 1 Minute. Die zweite Fraktion ist milchig-weiß, misst 1-3 ml, enthält den Hauptanteil an Spermien und wird innerhalb von 1 bis 2 Minuten abgegeben. Die dritte Fraktion kommt von der Prostata und stellt den Hauptanteil des Ejakulates dar. Ihr Volumen kann bei großen Rassen bis zu 30-40 ml betragen. Dieses wird innerhalb von 5 Minuten bis zu 1 Stunde abgegeben (Linde-Forsberg, 1991; 1995). Für die KB und die Konservierung des Spermas ist nur die

zweite Fraktion von Interesse (Fielden, 1971; Linde-Forsberg, 1991; 1995), da das Seminalplasma einen nachteiligen Effekt auf die Überlebensdauer sowie die Kältetoleranz der Samenzellen besitzt (Andersen, 1980).
Das gewonnene Sperma sollte vor abrupten Temperaturänderungen, übermäßigem Schütteln, Wasser, Desinfektions- und Reinigungsmitteln geschützt werden. Obwohl canines Sperma nicht so kälteempfindlich ist wie das Sperma anderer Haustierspezies, wie beispielsweise das von Rind oder Pferd, ist es jedoch sehr empfindlich gegenüber Hitze, sodass bis zur Weiterverarbeitung eine Aufbewahrung zwischen Körper- (37°C) und Raumtemperatur (20°C) empfohlen wird (Kutzler, 2005).

2.3 Spermauntersuchung

Ziel einer Spermauntersuchung ist die Voraussage der Befruchtungsfähigkeit einer Spermaprobe (Peña Martínez, 2004), weshalb sie integraler Bestandteil der Untersuchung auf Zuchttauglichkeit und auch im Rahmen der Herstellung von flüssig- oder kryokonserviertem Sperma (Riesenbeck et al., 2001) oder der KB (Peña et al., 2006) unerlässlich ist.
Zweck der Untersuchung von nativem Sperma ist es, die normale Funktion von Hoden und Nebenhoden zu beurteilen, wohingegen die Untersuchung von kryokonserviertem Sperma eher dahin gerichtet ist, den Grad an Zellschädigungen, der durch die Kryokonservierung verursacht wurde, zu ermitteln (Peña Martínez, 2004) und somit zu bestimmen, ob ein individuelles gefrorenes Ejakulat eine akzeptable Fertilität aufweist (Eilts, 2005a). Dennoch kann eine Samenuntersuchung nicht die Potentia generandi garantieren, sondern lediglich infertile Tiere und solche mit herabgesetzter Fertilität identifizieren, um sie von der Nutzung zur Spermagewinnung oder zur Zucht auszuschließen (Amann und Hammerstedt, 1993; Riesenbeck et al., 2001). Die Bestätigung der Fertilität kann nur durch einen Nachweis der Konzeption oder durch einen eingetretenen Zuchterfolg erbracht werden (Riesenbeck et al., 2001). Nach Amann und Hammerstedt (1993) ist die Fertilität von Sperma sehr hoher oder sehr niedriger Qualität relativ voraussagbar, wohingegen es bei Sperma mittlerer Qualität schwieriger ist, da es keine einzelnen Spermieneigenschaften gibt, die hoch und präzise mit der Fertilität in vivo korreliert sind. Erschwerend ist, dass jede

Spermaprobe zudem eine heterogene Population an Samenzellen (Subpopulationen) enthält, die nicht dasselbe Befruchtungspotenzial besitzen. Traditionelle Annäherungen an die Untersuchung der Spermaqualität ignorieren diese Heterogenität und betrachten eher den Mittelwert eines jeden Merkmals (Amann und Hammerstedt, 1993). Hinzu kommt, dass basierend auf einer großen Anzahl von Verpaarungen eine schlechte Spermaqualität zwar die durchschnittlichen Trächtigkeitsraten und die durchschnittliche Anzahl an Welpen beeinflusst, aber auf individueller Ebene dennoch zu Trächtigkeiten und normalen Wurfgrößen führen kann (Linde-Forsberg, 1991).
Subjektive Schätzungen von Spermaparametern sind durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, unter denen die Erfahrung der Untersucher eine wichtige Rolle spielt (Verstegen et al., 2002). Diese Subjektivität der Analyse bei der konventionellen mikroskopischen Untersuchung, insbesondere bei der Bestimmung der Motilität und der Pathomorphologie (Amann, 1989), macht den Vergleich von Ergebnissen aufgrund hoher Variabilität zwischen verschiedenen Laboren und Untersuchern schwierig (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a; 2001c).
Zusammenfassend ist die begrenzte Aussagekraft der mittels konventioneller lichtmikroskopischer Untersuchungstechniken gewonnenen Ergebnisse durch deren Subjektivität, Variabilität, der geringen Anzahl an untersuchten Samenzellen und der niedrigen Korrelation mit dem Befruchtungspotenzial bedingt, was die Notwendigkeit neuer, ergänzender in vitro Untersuchungstechniken, wie Computer-gestützten Methoden zur Beurteilung von Motilität und Morphologie sowie Durchflusszytometrie, erläutert (Peña Martínez, 2004; Rijsselaere et al., 2005).

2.3.1 Konventionelle Spermauntersuchung

Üblicherweise erfasste Ejakulatparameter sind Volumen, Aussehen, pH-Wert, Dichte, SGZ, Bewegungsaktivität der Samenzellen sowie die Anteile eosingefärbter und morphologisch abweichender Samenzellen (Günzel, 1986).

2.3.1.1 Makroskopische Untersuchung

Einleitend erfolgt die makroskopische Untersuchung. Hierbei werden Volumen, Farbe, Konsistenz, Geruch und etwaige Beimengungen beurteilt (Hoffmann, 2003b).

a) Volumen

Volumen und SGZ der spermienreichen Fraktion sind von der Körpergröße des Rüden abhängig (Günzel, 1986). Das Volumen des Gesamtejakulates variiert beim Hund von 0,5 bis 30 ml und ist abhängig von der Menge an aufgefangenem Prostatasekret (Soderberg, 1986). Das Volumen ist bei dieser Spezies nicht mit der Spermaqualität (Johnston, 1991; Root Kustritz, 2007) oder der Fertilität (Soderberg, 1986) korreliert. Die Messung des Volumens ist Bestandteil der Berechnung der SGZ im Ejakulat, welche ihrerseits einen Indikator der Spermaqualität darstellt (Root Kustritz, 2007).

b) Farbe

Physiologischerweise ist Hundesperma weiß (Seager und Platz, 1977b; Soderberg, 1986; Johnston, 1991). Sperma mit gelber Färbung deutet i. d. R. auf eine Verunreinigung mit Urin hin (Seager und Platz, 1977b; Soderberg, 1986), welcher toxisch für die Spermien ist (Soderberg, 1986). Auch Kontamination mit Eiter kann eine gelbliche Farbe verursachen (Freshman, 2002). Eine grüne Färbung kann durch Kontamination mit Eiter (Seager und Platz, 1977b) oder entzündlichem Exsudat (Johnston, 1991) zustande kommen. Sperma mit roter Färbung deutet im Allgemeinen auf frische Blutbeimengungen hin (Seager und Platz, 1977b; Freshman, 2002), während braune Färbung hämolysiertes Blut anzeigt (Freshman, 2002). Die häufigsten Gründe für Blut im Ejakulat sind Prostataleiden und traumatische Schädigung der stark vaskularisierten Schleimhautoberfläche des Penis (Soderberg, 1986; Freshman, 2002). Klare und farblose Ejakulate lassen sich bei Azoospermie finden (Johnston, 1991; Root Kustritz, 2007).

c) Konsistenz

Die physiologische Konsistenz bzw. Trübung von Hundesperma ist milchig bis sahnig (Seager und Fletcher, 1972; Seager und Platz, 1977b). Allerdings können auch Eiter, Akkumulation von Proteinen oder übermäßig viele Epithelzellen ein verdicktes Seminalplasma verursachen und dessen Lichtdurchlässigkeit mindern. In physiologischem Sperma ist die Trübung ein direkter Indikator der Spermienkonzentration (Seager und Fletcher, 1972), wobei eine undurchsichtige Probe i. d. R. auf eine hohe Spermienkonzentration hindeutet (Seager und Platz, 1977b).

d) Geruch

Bei der Beurteilung des Geruchs ist unter physiologischen Bedingungen allenfalls ein „geschlechtsspezifischer“ Geruch wahrzunehmen. Geruchliche Abweichungen können in Verbindung mit Blut- oder Eiterbeimengungen im Ejakulat auftreten (Hoffmann, 2003b).

e) Etwaige Beimengungen

Makroskopische Beimengungen in Form von Partikeln sind physiologischerweise nicht im Ejakulat erkennbar. Das Vorhandensein von Schmutzpartikeln deutet auf eine sekundäre Verunreinigung durch unsaubere Samengewinnung hin (Hoffmann, 2003b).

2.3.1.2 Chemisch-physikalische Untersuchung

Die chemisch-physikalische Untersuchung des Ejakulates besteht aus der Messung des pH-Wertes. Dieser wird mithilfe von Indikatorpapier bestimmt (Freshman, 2002). Alternativ kann auch ein pH-Meter verwendet werden (Bartlett, 1962b). Als physiologisch wird ein pH-Wert im Gesamtejakulat zwischen 6,3 und 6,6 (Seager und Platz, 1977b) bzw. 6,7 (Johnston, 1991) angesehen. In der ersten Fraktion liegt der mittlere pH-Wert bei 6,4, in der zweiten bei 6,2 und in der dritten bei 6,5 (Bartlett, 1962b). Bei Hunden mit bakterieller Infektion der Prostata können abweichende Werte gefunden werden, wobei der pH-Wert i. d. R. saurer wird. Dies kann für die Wahl des Antibiotikums von entscheidender Bedeutung sein, da sich beispielsweise in saurem Seminalplasma eher basische Antibiotika besser anreichern (Johnston, 1991). Im Falle einer Infektion stellt der pH-Wert also eine nützliche Hilfe bei der Auswahl eines geeigneten antibakteriellen Wirkstoffes dar (Freshman, 2002).

2.3.1.3 Mikroskopische Untersuchung

An die makroskopische Untersuchung schließt sich die mikroskopische Untersuchung des Spermas an. Diese umfasst die Beurteilung der Motilität der Samenzellen, der Intaktheit der Plasmamembran und des qualitativen und quantitativen Vorkommens morphologisch veränderter Samenzellen sowie die Bestimmung der Dichte und der SGZ. Weiterhin wird auf sonstige mikroskopische Beimengungen geachtet (Hoffmann, 2003b).

a) Motilität

Die Beurteilung der Motilität sollte sofort im Anschluss an die Spermagewinnung erfolgen (Johnston, 1991; Freshman, 2002). Flüssig- bzw. kryokonserviertes Sperma sollte vor der Untersuchung immer mindestens auf Raumtemperatur, besser jedoch auf 37°C, angewärmt werden (Linde-Forsberg, 1991). Unterschieden werden Massenbewegung, deren Nachweis von der Spermiendichte und der Motilität der einzelnen Samenzellen abhängig ist (Soderberg, 1986), sowie Einzelmotilität, bei deren Beurteilung es sich um eine subjektive Schätzung des Prozentsatzes an motilen Samenzellen handelt (Freshman, 2002).

Obwohl die Motilität nur eines der Merkmale eines fertilen Spermiums ist (Peña Martínez, 2004), stellt sie einen wichtigen sowie einfach und schnell zu ermittelnden Parameter bei der Beurteilung der caninen Spermaqualität dar (Johnston, 1991; Linde-Forsberg, 1991) und ist nach wie vor der am häufigsten genutzte Indikator für eine normale Spermienfunktion (Peña Martínez, 2004). Motilität ist ein Ausdruck der strukturellen und funktionellen Intaktheit der Samenzellen. Daher ist der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Samenzellen üblicherweise positiv korreliert mit dem Anteil an Samenzellen mit normaler Plasmamembranintegrität und normaler Morphologie (Ellington et al., 1993; Kumi-Diaka, 1993). In einer anormalen Bewegung spiegeln sich oft die strukturellen Defekte wieder, die bei der morphologischen Beurteilung gefunden werden. Eine schnelle Abnahme der Motilität nach der Spermagewinnung kann ein Anzeichen für geringe Fertilität des Spermas sein (Soderberg, 1986).

I. d. R. weisen Rüden mit hoher Fertilität > 80 % progressiv bewegliche Samenzellen auf (Soderberg, 1986), wobei mindestens 70-75 % vorwärtsbewegliche Samenzellen als Referenzwert angesehen werden (Fielden, 1971; Johnston, 1991; Linde-Forsberg, 1991; Freshman, 2002; Hoffmann, 2003b). Eine Verminderung der Spermienmotilität ist eine häufige, frühzeitig eintretende, nichtspezifische Veränderung, die bei Hunden mit einer Infektion oder anderen Erkrankungen gefunden werden kann (Johnston, 1991). Motile Spermien sind jedoch nicht zwangsläufig auch fertil, da z. B. nach der Kryokonservierung und dem Auftauen akrosomale Schädigungen und Veränderungen der Plasmamembran auftreten können, die zwar die Fertilität aber nicht die Motilität beeinflussen (Eilts, 2005a).

b) Lebend-Tot-Färbung

Zur Differenzierung von lebenden und toten Samenzellen kann eine Nigrosin-Eosin-Färbung genutzt werden. Nach Anfertigung des Ausstriches werden zur Beurteilung mindestens 200 Spermien ausgezählt, indem ungefärbte als lebend und gefärbte als tot gewertet werden. Nachteilig an dieser Untersuchungsmethode ist, dass die Interpretation von ungefärbt und gefärbt zwischen verschiedenen Untersuchern variieren kann (Campbell et al., 1956).

Riesenbeck et al. (2001) und Hoffmann (2003b) empfehlen im Gegensatz zur vorgenannten Methode zur Beurteilung des Anteils an lebenden Samenzellen die Supravitalfärbung mit Eosin als alleinigem Farbstoff. Bei toten Samenzellen ist die Plasmamembran permeabel für den Farbstoff Eosin, weshalb im Eosinausstrich rotgefärbte Spermien zum Zeitpunkt der Färbung tot waren (Hoffmann, 2003b).

Der Prozentsatz an „toten" (eosingefärbten) Spermien im Ejakulat bei Raumtemperatur variiert von 15 % in der zweiten Fraktion bis 20 % im Gesamtejakulat (Bartlett, 1962a; Christiansen, 1984b). Seager und Fletcher (1972) konnten Prozentsätze von 61 bis 99 % lebenden Spermien mit einem Mittelwert von 84,3 % ermitteln und auch nach Morton und Bruce (1989) beträgt die durchschnittliche Anzahl lebender Spermien 88 ± 9 %. Ein gesunder Rüde sollte daher über 84 % lebende Spermien aufweisen (Seager und Fletcher, 1972).

c) Morphologie

Die Morphologie der Samenzellen kann mittels konventioneller Lichtmikroskopie oder Phasenkontrastmikroskopie mit oder ohne Färbung untersucht werden (Root Kustritz et al., 1998). Grundsätzlich kommen für die morphologische Untersuchung von Hundespermien folgende Färbungen in Betracht: Färbung nach Papanicolaou (Seager und Platz, 1977b), Eosin (Hoffmann, 2003b), Eosin-Nigrosin (Seager und Platz, 1977b), Toluidinblau (Seager und Platz, 1977b), Diff-Quick (Johnston, 1991; Freshman, 2002), Spermac® (Oettlé und Soley, 1988; Oettlé, 1993; Riesenbeck et al., 2001; Hoffmann, 2003b) und Formolzitrat (Riesenbeck et al., 2001; Hoffmann, 2003b). Üblicherweise wird die Eosin-Nigrosin-Färbung verwendet; die Beurteilung der Spermiendefekte erfolgt bei 1000-facher Vergrößerung mit Ölimmersion (Soderberg, 1986).

Morphologische Veränderungen der Samenzellen können nach ihrem Ursprung in primäre, sekundäre und tertiäre Veränderungen (Christiansen, 1984b; Oettlé und Soley, 1988; Hoffmann, 2003c), in Haupt- (Major) und Nebendefekte (Minor)

(Oettlé und Soley, 1988) sowie nach ihrer Lokalisation in Kopf-, Mittelstück- und Schwanzveränderungen eingeteilt werden (Morton und Bruce, 1989):
Primäre Veränderungen entstehen während der Spermatogenese im Keimepithel der Hoden (Christiansen, 1984b; Hoffmann, 2003c). Die häufigste primäre Veränderung stellen proximale Zytoplasmatropfen dar (Morton und Bruce, 1989). Als sekundäre Veränderungen, welche nach dem Vorgang der Spermiation, d. h. nach Abgabe der Spermien in das Lumen der Tubuli seminiferi contorti, entstehen (Hoffmann, 2003c), können geknickte oder gekrümmte Schwänze, abgelöste Köpfe, distale Zytoplasmatropfen und abgelöste Akrosome angesehen werden (Johnston, 1991; Hoffmann, 2003c). Tertiäre Veränderungen entstehen nach Abgabe der Samenzellen aus dem männlichen Genitale und ähneln weitestgehend den sekundären Veränderungen (Hoffmann, 2003c).
Hauptdefekte sind erwiesenermaßen mit einer verminderten Fertilität assoziiert, während Nebendefekte erst zu einer herabgesetzten Fertilität führen, wenn sie in großer Anzahl auftreten (Oettlé und Soley, 1988).

Es gibt verschiedene Klassifikationsmöglichkeiten für das Spermiogramm des Hundes. Beispielhaft sei das Klassifikationsschema von Oettlé (Oettlé und Soley, 1988; Oettlé, 1993) angeführt:

1. Akrosomale Veränderungen:
   - Hauptdefekte: lippenartig, zystisch, anormale Verteilung
   - Nebendefekte: akrosomreagiert, geschwollen, schwere Schädigung, abgelöst
2. Kopfveränderungen:
   - Hauptdefekte: makrozephal, mikrozephal, pyriform, Kranzdefekte, andere Kernvakuolen, gefurchte Spermien, Doppelformen, starke Pleiomorphie/ bizarre Formen
   - Nebendefekte: schmale Köpfe, schmale Kopfbasis aber nicht pyriform, andere Kopfbasisdefekte, abaxiale Implantation, abgelöste Köpfe, nukleare Kondensation
3. Mittelstückveränderungen:
   - Hauptdefekte: Zytoplasmatropfen, gebrochene Mittelstücke, Pseudoplasmatropfen, abgeknickte Mittelstücke
   - Nebendefekte: distale Zytoplasmatropfen

4. Schwanzveränderungen:
   - Hauptdefekte: „dag“-Defekt, Doppelschwänze
   - Nebendefekte: einfach gekrümmte oder aufgerollte Schwänze, terminal aufgerollte Schwänze
5. Andere Zellen:
   Leukozyten, Spermienvorstufen
6. Spermienagglutination:
   Kopf an Kopf, Kopf an Schwanz, Schwanz an Schwanz, Agglutination an andere Zellen

Ein Nachteil dieses und anderer Schemata ist die Unfähigkeit zur Erfassung multipler Defekte einer Samenzelle (Oettlé, 1993). Wenn eine Samenzelle mehr als einen Defekt aufweist, wird sie entsprechend der wichtigsten Veränderung kategorisiert, oder aber entsprechend der dominierenden Veränderung, wenn die Defekte von gleicher Bedeutung sind (Oettlé und Soley, 1988; Oettlé, 1993).
Der Gesamtanteil an morphologisch veränderten Samenzellen sollte bei Normospermie einen Wert von 20 % nicht überschreiten (Seager und Platz, 1977b; Johnston, 1991; Riesenbeck et al., 2001; Hoffmann, 2003b).
Hunde können jedoch trotz einer Vielfalt „anormaler“ Spermien fertil sein, d. h. in den vergangenen zwölf Monaten einen Wurf gezeugt haben (Morton und Bruce, 1989). Die Beziehung zwischen Spermienmorphologie und Fertilität (Soderberg, 1986) bzw. die jeweilige Bedeutung von verschiedenen Arten von Defekten in Bezug auf die Fertilität (Linde-Forsberg, 1991) wurden beim Hund noch nicht ausreichend untersucht. Allerdings konnte Oettlé (1993) feststellen, dass der Grenzwert an morphologisch normalen Spermien, unter welchem die Fertilität nachteilig beeinflusst wird, bei 60 % liegt (61 % versus 13 % Fertilität). Während distale Plasmatropfen von Linde-Forsberg (1991) als unbedeutend für die Fertilität angesehen werden, konnten Nöthling et al. (1997) jedoch eine negative Korrelation von proximalen oder distalen Zytoplasmatropfen und der Motilität nach dem Auftauen nachweisen.

d) Dichte und SGZ

Die Dichte eines Ejakulates kann mittels Hämozytometer, Spektrophotometer, automatischem Zellzähler (Seager und Platz, 1977b; Christiansen, 1984b), Durchflusszytometrie oder Computer-gestützter Spermienanalyse (Kuster, 2005) bestimmt werden, wobei das Hämozytometer die gebräuchlichste Methode ist

(Seager und Platz, 1977b) und als Golden Standard angesehen werden kann (Hansen et al., 2006; Root Kustritz, 2007).

Da die Spermienkonzentration bzw. die Dichte im Wesentlichen von der Quantität des ejakulierten Prostatasekrets abhängt, ist die SGZ der entscheidende Parameter zur Beurteilung der Spermaqualität (Soderberg, 1986; Johnston, 1991). Die SGZ ist positiv korreliert mit der Körpergröße des Hundes und der daraus resultierenden Größe der Hoden (Olar et al., 1983; Günzel, 1986; Johnston, 1991; Freshman, 2002). Auch die Frequenz der Ejakulationen beeinflusst die SGZ pro Ejakulat (Boucher et al., 1958; Olar et al., 1983; England, 1999; Freshman, 2002). Die SGZ kann durch mangelhafte Stimulation (keine Hündin anwesend), Stress, Schmerzen oder andere Umweltfaktoren vermindert sein (Peña Martínez, 2004). Als Referenzbereich gilt eine SGZ im Ejakulat von 300 Mio. bis 2 Mrd. (Johnston, 1991). Ein Rüde durchschnittlicher Größe sollte mindestens 250-300 Mio. Samenzellen pro Ejakulat aufweisen (Freshman, 2002; Root Kustritz, 2007).

e) Mikroskopische Beimengungen

Während der mikroskopischen Untersuchung wird auf das Vorhandensein von Fremdbeimengungen geachtet. Es können weiße und rote Blutzellen, epitheliale Zellen von der inneren Auskleidung des Reproduktionstraktes und im Zusammenhang mit Infektionen zellulärer Debris gefunden werden (Johnston, 1991). Auch primäre Spermatozyten, welche auf eine Malfunktion des Spermatogeneseprozesses hindeuten, können vorkommen (Seager und Platz, 1977b).

Des Weiteren sollten auch Spermienagglutinationen berücksichtigt werden. Diese betreffen allerdings nicht das Anhaften an Eigelbpartikeln des Verdünners, an Debris oder an Luftblasen (Freshman, 2002).

2.3.2 Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test)

Dieser ursprünglich von Jeyendran et al. (1984) für die Humanmedizin entwickelte Test untersucht die funktionale Integrität der Spermienplasmamembran, indem deren Reaktion unter hypoosmotischen Bedingungen beobachtet wird (Jeyendran et al., 1992). England und Plummer (1993) sowie Kumi-Diaka (1993) wendeten ihn erstmals für die Untersuchung von caninem Sperma an. Im hypoosmotischen Milieu kommt es über die intakte Zellmembran zu einem Flüssigkeitstransport bis ein Gleichgewicht zwischen dem Inneren der Zelle und der Umgebung erreicht ist.

Aufgrund des Einstroms von Flüssigkeit vergrößert sich die Zelle, wodurch eine Auswölbung der Plasmamembran verursacht wird. Die Fibers (axonemaler Komplex) des Spermienschwanzes sind normalerweise von der Plasmamembran eng umschlossen. Wenn die Plasmamembran nun unter hypoosmotischen Bedingungen anschwillt, so tritt ein Einrollen und Verbiegen der Schwanzfibers innerhalb der Plasmamembran ein. Diese Schwanzveränderungen können mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops einfach sichtbar gemacht werden. Der Spermienschwanz erscheint dabei aufgerollt (Jeyendran et al., 1992). Dieses Phänomen wird als „tail curling“ (Jeyendran et al., 1992) oder „curled tail“ (Riesenbeck et al., 2001) bezeichnet. Die Ausprägung der typischen Aufrollung des Schwanzes kann unterschiedlich sein (siehe Abb. 1), wird aber trotzdem einheitlich als „curled tail“ benannt (Riesenbeck et al., 2001). Nur Samenzellen mit einer chemisch und physikalisch intakten Plasmamembran zeigen im hypoosmotischen Milieu „tail curling“. Obwohl der HOS-Test also in erster Linie nur die Integrität der Schwanzmembran erfasst, kann davon ausgegangen werden, dass eine funktionell intakte Schwanzmembran einen guten Indikator dafür darstellt, dass auch die Plasmamembran des Kopfes intakt ist. Die biochemische Integrität der Plasmamembran ist essentiell für die normale Spermienfunktion. Nicht nur die metabolischen Prozesse, die während der Spermienbewegung ablaufen, sondern auch die Vorgänge, die während der Befruchtung stattfinden, wie z. B. die Kapazitation, die Akrosomreaktion (AR) und die Bindung der Spermien an die Eizelloberfläche, sind auf die biochemische Integrität der Plasmamembran angewiesen (Jeyendran et al., 1992).
Als geeignet für den HOS-Test erwiesen sich 150 mosmol Natriumzitrat-Fruktose-Lösung (Jeyendran et al., 1984; England und Plummer, 1993; Riesenbeck et al., 2001), 60 mosmol Fruktose-Lösung (Kumi-Diaka, 1993) sowie 100 mmol Saccharose-Lösung (Pinto und Kozink, 2008). Der vorläufige Referenzbereich für normosperme Rüden liegt bei 80 bis 96 % aufgerollten Schwänzen („curled tail“) (Riesenbeck et al., 2001).

nc (not curled) 1 2 3 4 5 (geschädigt)

Abb. 1: Schematische Darstellung der Schwanzveränderungen von Rüdenspermien beim hypoosmotischen Schwelltest (HOS-Test); Spermien mit Schwanzveränderungen im Stadium 1-4 (schwarz): intakte Zellmembran; Spermien mit Schwanzveränderungen im Stadium 5 und not curled (nc) (grau): defekte Plasmamembran (Riesenbeck et al., 2001)

Der HOS-Test ist simpel, ökonomisch, klinisch leicht anwendbar und schnell durchzuführen, weshalb er eine nützliche Ergänzung zur Standardspermauntersuchung darstellt (Jeyendran et al., 1992; Pinto und Kozink, 2008). Im Gegensatz zu den gebräuchlichen Färbungen für die Untersuchung der Membran, wie z. B. der Eosin-Nigrosin-Färbung, die nur die strukturelle Integrität der Membran anzeigen, kann mit dem HOS-Test der funktionelle Status der Plasmamembran untersucht werden. Funktionelle und strukturelle Integrität der Plasmamembran sind entscheidend für die Viabilität der Spermien (Lechniak et al., 2002). Mithilfe dieses Tests können Rüden identifiziert werden, die trotz eines normalen Spermiogramms subfertil sind (Kumi-Diaka, 1993).

2.3.3 Computer-assisted sperm analysis (CASA)

Die Abkürzung CASA steht für Computer-aided semen analysis (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a) bzw. für Computer-assisted sperm analysis (Verstegen et al., 2002) und beschreibt ein automatisiertes System aus Hard- und Software zur Visualisierung und Digitalisierung sukzessiver Bilder von Spermien sowie zu deren Prozesssierung und der folgenden Analyse der Informationen (Amann und Katz, 2004). Basierend auf der Untersuchung individueller Samenzellen ermöglicht CASA eine objektive Beurteilung verschiedener Spermaparameter wie Konzentration, Motilität, Geschwindigkeit und Morphologie, bei letzterer

insbesondere die Morphologie des Spermienkopfes (Verstegen et al., 2002). Mit dem Ziel, die Genauigkeit und die Geschwindigkeit der Untersuchung zu optimieren und auch kleinste Veränderungen der Spermienbewegung zu erfassen (Ellington et al., 1993; Amann und Katz, 2004; Peña Martínez, 2004), dabei aber die Subjektivität menschlicher Untersucher zu vermeiden, wird die computerisierte Spermaanalyse immer häufiger routinemäßig in verschiedenen human- und veterinärmedizinischen Forschungs- sowie Diagnostiklaboren eingesetzt (Rijsselaere et al., 2003; Amann und Katz, 2004; Beletti et al., 2005).

Die erste Beschreibung eines Computer-gestützten Systems zur Verfolgung der Spermienbewegung stammt aus dem Jahr 1979 (Dott und Foster); die Erstbeschreibung des Einsatzes beim Hund erfolgte 1993 (Günzel-Apel et al.).

Trotz aller Objektivität ist es problematisch, dass die verschiedenen Systeme unterschiedliche Terminologien und Berechnungsformeln und auch verschiedene Softwareparameter/Einstellungen für die Spermienerkennung verwenden, was einen direkten Vergleich der numerischen Werte schwierig bzw. unmöglich macht (Amann und Katz, 2004; Hoogewijs et al., 2011). Gerade diese technischen Einstellungen sind aber wichtig, um die Bewegungsbahnen der einzelnen Spermien zu identifizieren und zu rekonstruieren (Rijsselaere et al., 2003), und sie beeinflussen daher die Datenausgabe in kritischer Weise (Ellington et al., 1993; Smith und England, 2001; Amann und Katz, 2004). Ohne Rücksicht auf die technischen Einstellungen, das verwendete System, die betreffende Spezies und die Spermabehandlung können CASA-Systeme irreführende oder fehlerhafte Daten liefern (Ellington et al., 1993; Smith und England, 2001; Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003).

Parallel zur Entwicklung der CASA-Systeme wurden spezielle Messkammern mit einer fixen Tiefe von 20 µm entwickelt, die es ermöglichten, alle Zellen ausreichend scharf darzustellen, um deren Digitalisierung zu erreichen (Amann und Katz, 2004). Die Qualität der Zählkammern beeinflusst die Ergebnisse deutlich (Hoogewijs et al., 2011) und ist daher, ebenso wie bei der manuellen Spermabeurteilung, eine der Fehlerquellen bei CASA-Systemen (Verstegen et al., 2002). Zudem hat auch die Beschickungstechnik der Kammern einen großen Einfluss auf die Motilitätsparameter und die ermittelten Konzentrationen (Hoogewijs et al., 2011).

Weitere wichtige Aspekte bei der Verwendung von CASA-Systemen sind die Temperaturkontrolle, die Nutzung eines geeigneten Phasenkontrastmikroskops,

die Probenvorbereitung (Amann und Katz, 2004) und die Analysezeit/-periode (Smith und England, 2001). Empfohlen werden eine konstante Untersuchungstemperatur von 37-38°C entsprechend der caninen Körper- und Uterustemperatur (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a; Amann und Katz, 2004) und Inkubationszeiten ≤ 1 Minute (Smith und England, 2001). Niedrigere Temperaturen sowie längere Inkubationszeiten führen zu einer negativen Beeinflussung der Spermaqualität bzw. der Motilität (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a; Smith und England, 2001).

Aufgrund der hohen Dichte der zweiten Fraktion caniner Ejakulate ist für die Untersuchung mittels CASA üblicherweise eine Verdünnung notwendig (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003; Schäfer-Somi und Aurich, 2007). Hier werden Konzentrationen von 50×10^6 Spermien pro ml (Rijsselaere et al., 2003) bzw. von 100×10^6 Spermien pro ml (Günzel-Apel et al., 1993; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a; Schäfer-Somi und Aurich, 2007) oder eine Verdünnung von 1 : 20 (Smith und England, 2001) empfohlen. Durch die Verdünnung des Spermas werden verschiedene Motilitätsparameter (Smith und England, 2001; Rijsselaere et al., 2003; Schäfer-Somi und Aurich, 2007) und die Membranintegrität (Schäfer-Somi und Aurich, 2007) in Abhängigkeit vom Grad der Verdünnung und der Zusammensetzung des verwendeten Verdünnermediums signifikant beeinflusst (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a; Smith und England, 2001; Amann und Katz, 2004). Das Verdünnermedium sollte keine Partikel enthalten, die eine ähnliche Größe wie die Spermienköpfe besitzen (z. B. nicht-geklärtes Eigelb oder Vollmilch-Verdünner), da diese sonst nicht von unbeweglichen Samenzellen unterschieden werden können (Verstegen et al., 2002). Demnach kommen Seminalplasma, physiologische Kochsalzlösung (isoosmolar mit dem Seminalplasma), Methylcellulose 0,3 mg (isoviskös mit dem Seminalplasma), PBS, autologes oder gepooltes Prostatasekret, TRIS-Verdünner, HEPES-TALP Medium, Eigelb-TRIS-Glukose-Verdünner, gefilterter Eigelb-TRIS-Fruktose-Verdünner oder gefilterter Magermilch-Verdünner in Frage (Günzel-Apel et al., 1993; Smith und England, 2001; Rijsselaere et al., 2003; Schäfer-Somi und Aurich, 2007).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die ausgewählten Computerparameter, die genutzte Software, die mikroskopischen Bedingungen und die Behandlung des Spermas zu einer neuen Quelle der Subjektivität führen können (Rijsselaere et al., 2003). Eine Standardisierung der technischen

Einstellungen wäre wünschenswert (Rijsselaere et al., 2003), da die Nutzung von CASA-Systemen nach Standardisierung theoretisch einen Vergleich zwischen verschiedenen Laboren ermöglicht (Günzel-Apel et al., 1993; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001c; Amann und Katz, 2004).

Entscheidender Nachteil der CASA-Systeme sind die hohen Anschaffungskosten (Verstegen et al., 2002). Weitere nachteilige Auswirkungen sind, dass die Untersucher dazu neigen, die lebenden Spermien während der klinischen Untersuchung nicht kritisch zu betrachten und die vorbehaltslose Akzeptanz, dass CASA einen „Golden Standard" der Spermienbewegung darstellt (Amann und Katz, 2004).

Das CASA-System SpermVision (Minitüb, Germany) ist im Vergleich zu anderen CASA-Systemen in der Lage, zusätzlich zu den Motilitätsparametern die Zellmembranintegrität objektiv zu beurteilen (Schäfer-Somi und Aurich, 2007). Zudem konnte während der Evaluation dieses CASA-Systems bei standardisierten Bedingungen eine hohe Genauigkeit und Wiederholbarkeit für fast alle untersuchten Parameter erzielt werden (Schäfer-Somi und Aurich, 2007).

2.3.3.1 Konzentrationsbestimmung

Die exakte Bestimmung der Spermienkonzentration mithilfe von CASA-Systemen stellt sich bei allen Spezies, bei denen dieser Parameter untersucht wurde, als problematisch dar. Meist wird die Spermienkonzentration überschätzt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Phänomen der Kollision von Samenzellen mit nachfolgender mehrfacher Zählung derselben individuellen Zellen. Die Überschätzung der Spermienkonzentration nimmt mit steigender Verdünnung zu (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a). Abweichungen zwischen den durch konventionelle Zählkammern und den mittels CASA bestimmten Spermienkonzentrationen können auch durch Verdünnerpartikel mit Spermien-ähnlicher Form und Größe verursacht werden, wenn die Verdünnermedien vor der Zugabe zum Sperma nicht gefiltert wurden (Günzel-Apel et al., 1993).

Nach Schäfer-Somi und Aurich (2007) korrelieren jedoch die Ergebnisse für die Konzentrationsbestimmung mit SpermCue, Thoma-Zählkammer und SpermVision signifikant miteinander und auch Rijsselaere et al. (2003) konnten hohe positive Korrelationen zwischen den mittels CASA (HTR Ceros 12.1) und den mittels Bürker-Zählkammer bestimmten Spermienkonzentrationen ermitteln. Bei letzteren

ließ sich im Allgemeinen allerdings eine Unterschätzung der Konzentration durch CASA beobachten, welche mit steigenden Spermienkonzentrationen größer wurde.

2.3.3.2 Motilitätsanalyse

Allgemein verwendete CASA-Parameter zur Beschreibung der Spermienmotilität sind:

- die Gesamtmotilität, ausgedrückt als Prozentsatz der Spermien mit VCL (velocity curvilinear) > 15 µm/s (Rigau et al., 2001)
- der Prozentsatz an vorwärtsbeweglichen Spermien, welche durch eine VAP (velocity average pathway) > 50 µm/s und eine STR (straightness) > 70 % definiert sind (Rijsselaere et al., 2003) bzw. der Prozentsatz an progressiven schnellen Spermien, welche durch eine minimale STR von 90 % definiert sind (Peña et al., 2003a)
- die kurvilineare Geschwindigkeit (VCL, velocity curvilinear), welche die mittlere Geschwindigkeit gemessen über die tatsächlich zurückgelegte Punkt-zu-Punkt Bahn der Samenzelle in µm/s darstellt (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003)
- die mittlere Geschwindigkeit (VAP, velocity average pathway), welche der mittleren Geschwindigkeit über die geglättete Bahn in µm/s entspricht (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003)
- die lineare Geschwindigkeit (VSL, velocity straight line), welche die durchschnittliche Geschwindigkeit gemessen über eine gerade Linie vom Anfang zum Ende der Bahn in µm/s repräsentiert (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003)
- die kurvilineare Strecke (DCL, distance curved line), welche die tatsächliche Distanz ist, die das Spermium während der Analyseperiode zurückgelegt hat, in µm (Schäfer-Somi und Aurich, 2007)
- die Durchschnittsstrecke (DAP, distance average path), welches die gemessene Distanz ist, wenn eine geglättete Linie als Referenz genutzt wird, in µm (Schäfer-Somi und Aurich, 2007)
- die geradlinige Strecke (DSL, distance straight line), welche die Distanz von dem Punkt, an dem sich die Samenzelle zu Beginn der Analyse befand, zu der Lokalisation der Zelle im letzten Bild der Analyse in einer geraden Linie darstellt, in µm (Schäfer-Somi und Aurich, 2007)

- die durchschnittliche seitliche Kopfauslenkung (ALH, amplitude of lateral head displacement), welche die mittlere Weite der Kopfoszillation der Spermien während des Schwimmens angibt, in µm (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003)
- die beat cross frequency (BCF), welches die Frequenz in Hertz (Hz) ist, mit der die Köpfe der Samenzellen die gemittelte Bahn der Spermien kreuzen (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003)
- der durchschnittliche Richtungswechsel des Kopfes (AOC, average orientation change), welches die durchschnittliche Gradzahl ist, die der Spermienkopf sich während der Analyse von links nach rechts bewegt hat; AOC < 9,5° zeigt an, dass Spermien passiv bewegt werden oder immotil sind (Schäfer-Somi und Aurich, 2007)
- die Geradlinigkeit (STR, straightness), welche der durchschnittliche Wert des Verhältnisses VSL/VAP in Prozent ist (diese Geradlinigkeit schätzt die Nähe des zurückgelegten Weges der Samenzelle zu einer geraden Linie mit dem Hintergrund, dass 100 % die optimale Geradlinigkeit darstellen) (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003)
- die Linearität (LIN, linearity), welche der durchschnittliche Wert des Verhältnisses VSL/VCL in Prozent ist (die Linearität beschreibt die Nähe der Bewegungsbahn zu einer geraden Linie) (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003)

Die Parameter DCL/VCL, DAP/VAP, DSL/VSL, ALH, BCF und AOC sind nachfolgend zum besseren Verständnis schematisch dargestellt (Abb. 2).

Abb. 2: Schematische Abbildung der verschiedenen durch Computer-assisted sperm analysis-Systeme gemessenen Motilitätsparameter; die fortlaufend nummerierten Punkte stellen die einzelnen Positionen des Spermiums zu den verschiedenen Zeitpunkten während der Analyseperiode dar; DSL = geradlinige Strecke, VSL = lineare Geschwindigkeit, DAP = Durchschnittsstrecke, VAP = mittlere Geschwindigkeit, DCL = kurvilineare (tatsächlich zurückgelegte) Strecke, VCL = kurvilineare Geschwindigkeit, ALH = durchschnittliche seitliche Kopfauslenkung, BCF = beat cross frequency, AOC = durchschnittlicher Richtungswechsel des Kopfes (nach Eder et al., 2009, modifiziert)

Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Samenzellen, der sich in der Geschwindigkeit (VAP) und der Geradlinigkeit (STR) der Motilität widerspiegelt, ist einer der wichtigsten Parameter (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a). Die Amplitude (ALH) und die Frequenz (BCF) der Kopfauslenkung der Spermien sind ebenso von Bedeutung, insbesondere für die Penetration der Zona pellucida (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a; Verstegen et al., 2002). Der Parameter ALH ist dabei so definiert, dass ein steigender Wert für ALH in einer steigenden kurvilinearen Geschwindigkeit (VCL) resultiert (Wijchman et al., 2001). An humanem Sperma konnte festgestellt werden, dass die Parameter VCL und ALH für ein bestimmtes Ejakulat charakteristisch sind und dessen Identifizierung ermöglichen (Wijchman et al., 2001).

Insgesamt besteht bei humanen Ejakulaten eine positive Korrelation zwischen einer hohen Gesamtmotilität und hohen Spermiengeschwindigkeiten (Wijchman et al., 2001). Ebenso sind die Parameter Gesamtmotilität, VCL und BCF hoch

korreliert mit der Penetrationsrate humaner Oozyten (Fetterolf und Rogers, 1990). Bei Untersuchungen an bovinem Sperma konnten bei kollektiver Korrelation verschiedener Parameter mit der Fertilität, definiert als Non-Return-Rate von 59 Tagen, signifikante Zusammenhänge ermittelt werden. Die engste Korrelation bestand dabei für die Parameterkombination ALH, BCF, LIN, VAP und VSL. Diese Zusammenhänge lassen den Schluss zu, dass die potentielle Fertilität eines Bullen auf Basis der Bewegungsqualität der Spermien abgeschätzt werden kann (Farrell et al., 1998).

2.3.3.3 Viabilitätsanalyse

Die Integrität der Plasmamembran ist essentiell für die Befruchtungsfähigkeit von Spermien. In letzter Zeit wurden verschiedene Fluoreszenzfärbungen für die Untersuchung der Spermienmembranintegrität bei Hunden genutzt und validiert (Rijsselaere et al., 2005):

- Carboxyfluoresceindiacetat (CFDA) in Kombination mit Propidiumiodid (PI) (Rota et al., 1995; Peña et al., 1998b; Hermansson und Linde-Forsberg, 2006)
- SYBR-14 in Kombination mit PI (Rijsselaere et al., 2002a; Yu und Leibo, 2002; Niżański, 2006; Schäfer-Somi und Aurich, 2007)
- Carboxy-Seminaphthorhodfluor (Carboxy-SNARF) in Kombination mit PI (Peña et al., 1999)
- Calcein-AM in Kombination mit Ethidiumhomodimer (Calcein-AM/EthD-1) (Sirivaidyapong et al., 2000)
- Hoechst 33258 (Hewitt et al., 2001)

Aufgrund des weitverbreiteten Einsatzes soll im Folgenden ausschließlich auf die SYBR-14/PI-Färbung eingegangen werden:

SYBR-14 ist ein fluoreszierender, membranpenetrierender Nukleinsäure-Farbstoff, der bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm maximal absorbiert und bei 518 nm emittiert, wenn er an die DNA gebunden ist. Mikroskopische Untersuchungen haben ergeben, dass SYBR-14 die Zellkerne lebender Zellen hellgrün färbt, was durch simultane Untersuchung von Fluoreszenz und Motilität bestimmt werden konnte. Im Gegensatz dazu färbt der Farbstoff PI nur nicht-motile Spermien, die ihre Membranintegrität verloren haben, da er membranimpermeabel ist und somit nur in geschädigte (permeable) Zellen eindringen kann. PI bindet ebenfalls an die zelluläre DNA und emittiert bei

Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm rote Fluoreszenz (Harrison und Vickers, 1990; Garner und Johnson, 1995).
Vorteil von SYBR-14 gegenüber den enzymbasierten Färbungen ist zum einen, dass die Färbungszeit nicht so kritisch ist und zum anderen, dass eine Hintergrundfärbung so gut wie nicht existent ist (Garner und Johnson, 1995).
Die Auswertung der Fluoreszenzfärbungen erfolgt entweder flowzytometrisch oder fluoreszenzmikroskopisch durch Auszählen der Spermien (Waberski et al., 1999), wobei Letzteres mühsam, zeitbeanspruchend und subjektiv ist und zudem nur eine geringe Anzahl an Zellen pro Probe untersucht werden kann (Peña et al., 1998b). Die Möglichkeit, eine große Anzahl an fluoreszenzmarkierten Spermien mittels Durchflusszytometrie zu analysieren, ist als größter Vorteil der Fluoreszenzfärbetechniken anzusehen (Peña et al., 1998b; Waberski et al., 1999; Rijsselaere et al., 2005). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass fluorenzenzgefärbte Spermien auf ihre funktionellen und morphologischen Aspekte hin untersucht werden können, ohne dass es zu einer Interferenz mit extrazellulären Medien kommt, was insbesondere bei konserviertem Sperma von Bedeutung ist (Peña Martínez, 2004).
Garner und Johnson (1995) konnten mittels SYBR-14/PI-Färbung folgende drei Spermienpopulationen beobachten: lebende Spermien - SYBR-14-gefärbt, tote Spermien - PI-gefärbt und moribunde Spermien - doppelt gefärbt, da die Membranintegrität schwindet.
Beim Vergleich der Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung mit SYBR-14 und PI mit den Ergebnissen einer konventionellen Eosin-Nigrosin-Färbung stellte die Fluoreszenzfärbung die sensitivere Methode dar, da auch kleinste, durch die Zentrifugation verursachte Membranschäden erkannt werden konnten, welche bei der Eosin-Nigrosin-Färbung nicht gefunden wurden (Rijsselaere et al., 2002a).

2.4 Spermakonservierung

Bei der Spermakonservierung unterscheidet man die Flüssigkonservierung für eine kurzzeitige Lagerung durch Verdünnung und Kühlung auf 5°C und die Kryokonservierung, welche eine zeitlich unbegrenzte Konservierung bei - 196°C in flüssigem Stickstoff ermöglicht (Günzel, 1986). Eine weitere Möglichkeit zur Konservierung von Hundesperma ist die Mikroeinkapselung des Spermas in Gel-

Mikrokapseln (0,75 % oder 1 % Natriumalginat) oder polykationische Mikrokapseln (zusätzlich Poly-L-Lysin) und deren anschließende Lagerung bei 4°C. Bei polykationischer Mikroeinkapselung mit einer Alginatkonzentration von 1 % lässt sich canines Sperma erfolgreich kühl lagern und erhält seine Motilität und Viabilität für bis zu sieben Tage (Shah et al., 2010). Auf die letztgenannte Konservierungsform wird im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen.
Unabhängig davon, welche Konservierungsform angestrebt wird, sollte das Sperma nach der Gewinnung so schnell wie möglich weiterverarbeitet werden (Kibble, 1969).

Während die Initialmotilität in unverdünntem Sperma annähernd identisch mit der in verdünntem Sperma ist (Günzel, 1986), sinkt bei unverdünntem Sperma, das bei 4°C aufbewahrt wird, die durchschnittliche Motilität nach einer Lagerungsdauer von zwei Tagen auf Werte < 20 %, wobei der Anteil an Samenzellen mit morphologischen Veränderungen rapide ansteigt (Tsutsui et al., 2003b). Im Vergleich hierzu reduziert sich die erzielte Konzeptionsrate von 80 % nach einem Tag Lagerung auf 30 % nach zwei Tagen, was durch eine Verdopplung der Inseminationsdosis von 200 auf 400×10^6 Spermien kompensiert werden kann (Konzeptionsrate 70 %) (Tsutsui et al., 2003b). Generell ist die Nutzung von unverdünntem Sperma nicht so erfolgreich wie die von verdünntem, was auf die schädlichen Eigenschaften des Prostatasekretes oder anderer Komponenten des Seminalplasmas zurückzuführen ist (Concannon und Battista, 1989).
Da bei der Spermakonservierung auch bei optimaler Methodik ein gewisser Vitalitätsverlust der Samenzellen unvermeidbar ist, müssen an das Ausgangsmaterial besonders hohe Anforderungen gestellt werden. Daher sollten für die Flüssig- und Kryokonservierung ausschließlich Ejakulate verwendet werden, die den Anforderungen in Tab. 2 genügen (Pesch et al., 2007).

Tab. 2: Qualitätskriterien für Rüdenejakulate (Pesch et al., 2007)

Kriterium	Referenzwert
vorwärtsbewegliche Spermien (%)	≥ 75
morphologisch veränderte Spermien (%)	≤ 20
pH-Wert	6,2-7,2
Gesamtspermienzahl ($\times 10^9$)	≥ 0,3-1,0[1]
Volumen spermienreiche Fraktion (ml)	0,5-2,0

[1]abhängig von der Körpergröße; z. B. Dackel ≥ 0,3, Dobermann > 1,0

2.4.1 Flüssigkonservierung

Ziel dieser Art der Spermakonservierung ist es, die Befruchtungsfähigkeit der Spermien über einen möglichst langen Zeitraum zu erhalten (Hoffmann, 2003d), indem die Keimzellen bei niedrigen Temperaturen aufbewahrt werden, ohne dass der Gefrierpunkt erreicht wird (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Lopes et al., 2008), da dies intrazelluläre Schädigungen verursachen würde, welche die Viabilität und die Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen beeinflussen können (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b). Bereits durch die Zugabe eines geeigneten Verdünners zum Ejakulat wird eine Verlängerung der Lebensspanne der Samenzellen erreicht (Hoffmann, 2003d). Der Verdünner stellt Energie bereit, hält den pH-Wert und die Osmolarität aufrecht und schützt die Plasmamembran sowie das Akrosom vor Schädigungen durch Temperaturschwankungen und Erschütterungen beim Transport (Linde-Forsberg, 1991; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007). Eine darüber hinausgehende Konservierung ergibt sich aus der Abkühlung des Spermas auf 4-5°C, welche den Metabolismus der Samenzellen herabsetzt (Linde-Forsberg, 1995; Hoffmann, 2003d; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007) und dadurch deren Langlebigkeit erhöht (Linde-Forsberg, 1995). Der Erhalt der Befruchtungsfähigkeit der Spermien in verdünntem und gekühltem Sperma basiert somit auf drei Faktoren: 1) geringerer Metabolismus der Spermien bei niedrigerer Temperatur, 2) Schutz vor Kälteschock durch den Verdünner und 3) inhärente Resistenz von Hundespermien gegen Kälteschock (Bouchard et al., 1990).

Zu Beginn der KB beim Hund wurde der Verdünnung und Konservierung von Sperma wenig Aufmerksamkeit geschenkt (Harrop, 1956). In letzter Zeit ist die KB mit flüssigkonserviertem Sperma jedoch zu einem interessanten Instrument in der Hundezucht geworden (Rota et al., 1995; Peña et al., 2006; Kmenta et al., 2011). Dieser Erfolg kann durch viele Gründe erklärt werden: Zum einen ist es relativ einfach, flüssigkonserviertes Sperma herzustellen (Peña et al., 2006), da keine besonderen Einrichtungen erforderlich sind (Pesch et al., 2007), zum anderen können durch den verbreiteten Gebrauch der Serum-Progesteronbestimmung mit flüssigkonserviertem Sperma gute Trächtigkeitsraten und optimale Wurfgrößen erzielt werden (Peña et al., 2006). Außerdem hat die Entwicklung der Rassezucht eine steigende Nachfrage nach Spermaimport und -export verursacht (Peña et al., 2006) und gerade bei der Flüssigkonservierung sind die Versandkosten (one way) gering (Linde-Forsberg, 2001). Allerdings erfordert die Verwendung von

flüssigkonserviertem Sperma neben der kurzfristigen Verfügbarkeit des Spenderrüden einen schnellen Samentransport (Pesch et al., 2007). Das größte Problem bei der Flüssigkonservierung von Sperma stellt jedoch die begrenzte Überlebensdauer der konservierten Samenzellen dar (Ponglowhapan et al., 2004; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007).

2.4.1.1 Herstellung von flüssigkonserviertem Sperma

Grundlage für die Herstellung von flüssigkonserviertem Sperma ist die zweite, spermienreiche Fraktion des Ejakulates (Brochart und Coulomb, 1952; Seager und Fletcher, 1972; Andersen, 1980; Peña et al., 2006). Ob Seminalplasma enthalten sein darf oder nicht, wird aufgrund der zahlreichen positiven (antioxidativ, höhere Osmotoleranz, erhöhte Membranstabilität) und negativen Eigenschaften (reaktive Sauerstoffspezies, reduzierte Überlebensdauer und Gefriertoleranz) kontrovers diskutiert (Andersen, 1980; Sirivaidyapong et al., 2001; Rijsselaere et al., 2002a; Peña et al., 2006; Koderle et al., 2009; Strzeżek und Fraser, 2009). Die Gegner der Prostatabeimengungen postulieren verschiedene Zentrifugationsprotokolle zur Entfernung des Prostatasekrets (Rota et al., 1995; Linde-Forsberg, 2001; Sirivaidyapong et al., 2001; Rijsselaere et al., 2002a; Ponglowhapan et al., 2004; Hermansson und Linde-Forsberg, 2006; Günzel-Apel, 2007; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007; Beccaglia et al., 2009a; Lopes et al., 2009a; Niżański et al., 2009; Michael et al., 2010; Shah et al., 2010).
Ein Nachteil des Zentrifugierens von verdünntem Sperma ist, dass ein Teil der Samenzellen im Überstand verloren geht, wenn relativ niedrige Zentrifugationsgeschwindigkeiten von 180 x g oder 720 x g verwendet werden (Rijsselaere et al., 2002a). Tendenziell nimmt der Anteil an verlorenen Spermien mit steigender Zentrifugationsgeschwindigkeit und steigender initialer Spermienkonzentration ab; jedoch führen zu hohe Geschwindigkeiten wie 1620 x g und 2880 x g zu einer Schädigung der Spermienmembran, sodass ein Zentrifugationsprotokoll von fünf Minuten bei 720 x g als optimal angesehen wird (Rijsselaere et al., 2002a). Obwohl nach Günzel (1986) und Rijsselaere et al. (2002a) die Zentrifugation weder auf die Gesamtmotilität und die Vorwärtsbeweglichkeit noch auf die akrosomale Integrität einen nachteiligen Einfluss besitzt, konnten Koderle et al. (2009) infolge der Zentrifugation eine Reduktion der Motilität nach dem Auftauen und eine Erhöhung des Prozentsatzes an morphologisch anormalen Spermien sowie des Grades der

Chromatindenaturierung der Spermien im Zeitverlauf nachweisen, sodass zumindest vor der Kryokonservierung das Zentrifugieren nicht länger per se empfohlen werden kann.

Die Zugabe des Verdünners zum Sperma sollte umgehend nach der Gewinnung (Foote und Leonard, 1964) tropfenweise unter leichtem Schwenken erfolgen (Pesch et al., 2007), wobei Verdünner und Sperma die gleiche Temperatur, ca. 35°C (Andersen, 1980; Nishiyama et al., 1999), haben sollten (Linde-Forsberg, 1991; 1995).

Die Verdünnungsrate (Verhältnis von Ejakulat zu Verdünner) variiert von 1 : 1 bis 1 : 20 (Foote, 1964a; Foote und Leonard, 1964; Andersen, 1980; Christiansen, 1984a; Linde-Forsberg, 1991; Nishiyama et al., 1999; Pinto et al., 1999; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007), wobei üblicherweise Verdünnungen zwischen 1 : 3 und 1 : 5 eingesetzt werden (Günzel, 1986; Linde-Forsberg, 1991; 1995; Peña et al., 2006). Andere Autoren empfehlen eine Verdünnung auf eine Dichte von 100-200 bzw. 300×10^6 Samenzellen pro ml (Tsutsui et al., 2003b; Ponglowhapan et al., 2004; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007; Lopes et al., 2009a; Niżański et al., 2009). Optimalerweise ist die Verdünnung von der initialen Spermienkonzentration, der Anzahl der zu besamenden Hündinnen oder der Größe der Hündinnen abhängig (Peña et al., 2006). Eine zu hohe Verdünnung kann die Motilität negativ beeinflussen (Linde-Forsberg, 1995).

2.4.1.2 Lagerung bzw. Versand

Üblicherweise erfolgt die Lagerung des flüssigkonservierten Spermas bei 4°C (Andersen, 1980; Rota et al., 1995; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Hermansson und Linde-Forsberg, 2006; Pesch et al., 2007; Michael et al., 2010) bzw. bei 5°C (Foote, 1964a; Foote und Leonard, 1964; Province et al., 1984; Kumi-Diaka und Badtram, 1994; Linde-Forsberg, 2001; Ponglowhapan et al., 2004; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007; Beccaglia et al., 2009a; Niżański et al., 2009), da diese Temperaturen höheren Lagerungstemperaturen überlegen sind (Bouchard et al., 1990). Einzig auf den Anteil an akrosomreagierten Spermien wirkt sich die Temperatur von 5°C nachteilig aus (Kumi-Diaka und Badtram, 1994). Beim Versand ist nach Linde-Forsberg (1991) für die meisten Transportdistanzen jedoch eine Temperatur von 10 bis 15°C ausreichend.

Für die Aufbewahrung kann ein steriles Plastikröhrchen mit Schraubverschluss (Linde-Forsberg, 1991; 2001; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007) oder eine Spritze (Lopes et al., 2008) verwendet werden, welche, verglichen mit Glasröhrchen (Tsutsui et al., 2003b), beim Transport nicht zerbrechen können (Linde-Forsberg, 1991; 2001). Das verdünnte Sperma sollte im Dunkeln gelagert werden (Nishiyama et al., 1999; Peña et al., 2006).
Um eine zu schnelle Abkühlung zu vermeiden, wird das Röhrchen in einem mit Wasser von Raumtemperatur gefüllten Glas platziert und mit diesem zusammen für eine halbe bis vier Stunden (Andersen, 1980; Linde-Forsberg, 1991; Peña et al., 2006) in den Kühlschrank gestellt, bevor es versandfertig gemacht wird (Peña et al., 2006). Das Wasser im Becherglas verhindert einen Kälteschock während des Kühlungsprozesses (Rijsselaere et al., 2002a) und vermindert Temperaturvariationen während des Aufbewahrungszeitraumes (Linde-Forsberg und Forsberg, 1993). Eine weitere Möglichkeit zur Herunterkühlung des Samens auf 5°C besteht darin, das verdünnte Sperma für zwei Stunden in eine Styroporbox im Kühlschrank zu verbringen (Pesch et al., 2007). Um die Temperatur auf 4°C abzusenken, kann auch ein programmiertes Niedrig-Temperatur-Bad (UH-JF, Chino Ltd., Japan) eingesetzt werden, welches das Sperma innerhalb einer Periode von einer Stunde auf die gewünschte Temperatur abkühlt (Tsutsui et al., 2003b). Unabhängig von der Methode ist das Ziel des langsamen Abkühlens eine Reduktion der Effekte des Kälteschocks (Ponglowhapan et al., 2004; Hermansson und Linde-Forsberg, 2006; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007; Niżański et al., 2009); am geringsten werden Gesamtmotilität und Vorwärtsbeweglichkeit bei Kühlraten von - 0,3 bis - 1°C pro Minute beeinflusst (Bouchard et al., 1990). Um Temperaturen unter 0°C zu umgehen, sollte das das Sperma enthaltende Gefäß vor direktem Kontakt mit Eiswürfeln oder Kühlakkus geschützt werden, was beispielsweise durch Einwickeln in ein Stück Stoff erreicht werden kann, bevor es in das Versandbehältnis verbracht wird (Linde-Forsberg, 2001).
Als Versandbehältnis können eine Thermosflasche, vorzugsweise mit weiter Öffnung (Linde-Forsberg, 1991), eine Styroporbox mit einem Kühlakku (Linde-Forsberg, 2001) oder der Equitainer® (Lopes et al., 2009a) zum Einsatz kommen. Lopes et al. (2009a) verglichen drei verschiedene Transportcontainer zum Versand von flüssigkonserviertem Hundesperma: eine Styroporbox (Minitüb), eine mit crushed Eis gefüllte Thermosflasche und den Equitainer® (Minitüb). Während

nach 24 Stunden Lagerung alle drei Behältnisse ähnliche Ergebnisse bezüglich der Erhaltung der Spermaqualität lieferten, war nach 72 Stunden die Spermaqualität der Proben, die im Equitainer® gelagert wurden, deutlich besser.
Eine tierärztliche Bescheinigung, die alle nötigen Informationen über den Zuchtrüden einschließlich Gesundheitsstatus, Qualität und Charakteristika des Spermas enthält, sollte dem Sperma beim Versand beigefügt werden (Peña et al., 2006).
Vor der Verwendung zur KB sollte das flüssigkonservierte Sperma langsam auf Raumtemperatur angewärmt werden (Linde-Forsberg, 1995).

2.4.1.3 Überlebensdauer

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, liegt das größte Problem bei der Flüssigkonservierung von Sperma in der begrenzten Überlebensdauer der konservierten Samenzellen (Ponglowhapan et al., 2004; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007). Die Zugabe des Verdünners verursacht zwar keine signifikanten ultrastrukturellen Veränderungen an den Spermien, die Kühlung aber resultiert in einem unmittelbaren Anstieg des Prozentsatzes an akrosomalen Schädigungen und einem darauffolgenden Abfall der Viabilität. Die Auswirkungen der Kühlung auf die Ultrastruktur der Spermien können unmittelbar oder verzögert auftreten. Die unmittelbaren Effekte führen zum Tod oder zur Befruchtungsunfähigkeit der Samenzellen durch akrosomale Schädigungen, die verzögerten Effekte reduzieren die Langlebigkeit der Spermien durch eine Veränderung der Plasmamembranstruktur (Burgess et al., 2001).
Nach Linde-Forsberg (1991) kann flüssigkonserviertes Hundesperma, eine gute Ausgangsqualität vorausgesetzt, seine Befruchtungsfähigkeit für mindestens 12 bis 24 Stunden erhalten, gewöhnlich auch deutlich länger, sodass es für nationale sowie für viele internationale Transporte genutzt werden kann. Allerdings lassen sich hinsichtlich der genauen Dauer der Erhaltung der Befruchtungsfähigkeit in der Literatur keine konkreten Angaben finden. Es besteht jedoch kein Zweifel daran, dass die Qualität von gekühltem Sperma mit steigender Lagerungsdauer abnimmt (England und Ponzio, 1996; Ponglowhapan et al., 2004) und auch die Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen aufgrund oxidativer Schädigung verringert wird (Lopes et al., 2008). Die zeitliche Abnahme der Befruchtungsfähigkeit von flüssigkonserviertem Sperma ist aber schwierig einzuschätzen, da sie offensichtlich nur bedingt mit der Abnahme der Motilität korreliert (Pesch et al.,

2007). So sinkt das Befruchtungspotential von Spermien bereits circa eine Woche vor einem zu beobachtenden Motilitätsabfall deutlich ab (Peña et al., 2006). Aus diesem Grund wird trotz Erhalt von Motilität und Membranintegrität über mindestens fünf bis sieben Tage (Peña et al., 2006) empfohlen, flüssigkonserviertes Sperma innerhalb von zwei bis drei Tagen nach der Gewinnung zu verwenden (Günzel, 1986; Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007). Bei Nutzung von länger gelagertem Flüssigsperma sinken die Befruchtungschancen, da sich die Anzahl fertiler Samenzellen mit zunehmender Lagerungsdauer rasch reduziert (Günzel, 1986).

Nach Niżański (2009) bleibt die Befruchtungsfähigkeit von flüssigkonserviertem Sperma für mehrere Tage erhalten und die mit diesem Sperma erzielten Trächtigkeitsraten sind zufriedenstellend, aber abhängig von der Lagerungsdauer. Tsutsui et al. (2003b) konnten nach einer Lagerungsdauer von vier Tagen in einem TRIS-Fruktose-Eigelb-Zitrat-Verdünner bei intravaginaler Besamung mit einer Besamungsdosis von 4×10^8 Samenzellen eine Konzeptionsrate von 83,3 % (mittlere Wurfgröße $3{,}2 \pm 1{,}3$) erzielen. Verstegen et al. (2005) konnten zeigen, dass sogar nach einer mittleren Lagerungsdauer von $9 \pm 1{,}8$ Tagen mit flüssigkonserviertem Sperma noch akzeptable Trächtigkeitsraten erreicht werden können. Bei einmaliger intravaginaler Besamung erzielten sie eine Trächtigkeitsrate von 50 % mit einer durchschnittlichen Wurfgröße von $2{,}3 \pm 1{,}4$ Welpen, bei zweimaliger intravaginaler Besamung eine Trächtigkeitsrate von 70 % mit durchschnittlich $4{,}6 \pm 2{,}8$ Welpen pro Wurf. Dies deutet darauf hin, dass die Befruchtungsfähigkeit der Spermien für mindestens zehn Tage aufrechterhalten werden kann (Verstegen et al., 2005).

In mit TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünner verdünntem Sperma zeigen noch mindestens 50 % der Spermien nach 13 ± 1 Tagen Lagerung eine gute Motilität und auch nach 16 Tagen kann noch eine geringe Anzahl an motilen Samenzellen nachgewiesen werden (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass mit einem TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünner eine gute Spermaqualität über bis zu zehn (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b) bzw. vierzehn Tage (Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007) konserviert werden kann und auch die Befruchtungsfähigkeit erhalten bleibt (Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007). Allerdings sind Untersuchungen in vivo notwendig, um diese Schlussfolgerung zu bestätigen (Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007).

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Befruchtungsfähigkeit von Samenzellen in vitro bietet der Zona pellucida (ZP)-Bindungstest, welcher die Fähigkeit der Spermien, an eine homologe Eizelle zu binden, misst (Ström Holst et al., 2000). Mittels dieses Tests konnte festgestellt werden, dass die Flüssigkonservierung bei 4°C für vier Tage die ZP-Bindungsfähigkeit der Samenzellen tendenziell reduziert, wenngleich die mittlere Anzahl der an die ZP gebundenen Spermien nach einem Tag Lagerungsdauer sich nicht signifikant von der nach vier Tagen unterscheidet. Dennoch sprechen die Ergebnisse für einen negativen Effekt der längeren Flüssigkonservierung auf die ZP-Bindungsfähigkeit von caninen Spermien (Ström Holst et al., 2000) bzw. deuten darauf hin, dass mit steigender Lagerungsdauer die ZP-Bindungsfähigkeit der flüssigkonservierten Samenzellen abnimmt (Ponglowhapan et al., 2004). Auch Hermansson et al. (2006) bestätigen dies, indem sie zeigen konnten, dass nach einer Stunde Inkubation die ZP-Bindungsfähigkeit von für einen Tag gelagerten Spermien besser ist als die von für zwei Tage gelagerten.
Bei einer vergleichenden Untersuchung der Penetration der ZP von in vitro gereiften Oozyten durch frische und flüssigkonservierte Spermien zeigen frische Spermien eine höhere mittlere Penetrationsrate. Allerdings kann während der ersten Stunde der Ko-Inkubation von Spermien und Eizellen bei gekühlten Spermien ein höherer Prozentsatz an Penetration gesehen werden als bei frischen Spermien (De los Reyes et al., 2009). Dies deutet darauf hin, dass durch Konservierungsmaßnahmen kapazitationsartige Veränderungen initiiert und beschleunigt werden (Rota et al., 1999b). Auch nach Kumi-Diaka und Badtram (1994) ist es wahrscheinlich, dass die Lagerung von Sperma bei 5°C die AR initiiert bzw. triggert. Dabei hat die Zusammensetzung des Verdünnermediums, insbesondere dessen Ca^{2+}-Konzentration, einen entscheidenden Einfluss auf die Inzidenz der AR; hohe Ca^{2+}-Konzentrationen fördern die AR, während niedrige sie verzögern (Sirivaidyapong et al., 2000). Im Gegensatz dazu konnten Hermansson et al. (2006) feststellen, dass sowohl nach einer als auch nach vier Stunden Ko-Inkubation die Anzahl der an die ZP gebunden Spermien pro Eizelle bei frischem Sperma höher ist als bei flüssigkonserviertem Sperma.

Ponglowhapan et al. (2004) konnten eine Überlebensdauer der bei 5°C gelagerten Samenzellen von 23 Tagen beobachten.

Die Langlebigkeit der Samenzellen kann durch neues Substrat, d. h. durch Zentrifugieren des gekühlten, verdünnten Samens, Entfernen des Überstandes und Zusatz von frischem Verdünner, gesteigert werden. So verlängert die Zugabe von frischem Verdünner an Tag 11 der Lagerung den Erhalt der Motilität der Samenzellen bis zu Tag 21, verglichen mit Tag 16 bei Proben ohne Mediumaustausch. Erfolgt an Tag 21 ein zweiter Austausch des Substrates, so kann die Konservierung der Motilität bis Tag 27 ausgedehnt werden. Durch einen weiteren Mediumaustausch an Tag 27 ist jedoch keine Motilitätsstimulation mehr möglich (Verstegen et al., 2005). Die Mechanismen, welche die Reaktivierung und Verlängerung der Motilität bewirken, sind möglicherweise durch den erneuten Zusatz von Glukose und frischem Eigelb sowie durch die Entfernung schädlicher Metaboliten aus dem Medium bedingt (Verstegen et al., 2005). Zusammenfassend besteht durch Verdünneraustausch also die Möglichkeit, die Konservierung der Motilität von Flüssigsperma auf bis zu drei Wochen auszudehnen (Verstegen et al., 2005). Inwieweit dies auch auf die Befruchtungsfähigkeit zutrifft, ist unbekannt. Allerdings konnte eindeutig gezeigt werden, dass offensichtliche Motilität oder Immotilität kein verlässliches Kriterium zur Einschätzung des Fertilitätspotenzials von caninem Sperma darstellt, da nicht-motile Spermien durch Hinzufügen eines adäquaten Mediums ihre Motilität wiedererlangen und fertil bleiben können (Verstegen et al., 2005).

Interessant ist zudem die Option, Hundesperma nach einer Kühllagerung für die Dauer von ein oder zwei Tagen zu kryokonservieren, ohne signifikante Verschlechterung der Motilität nach dem Auftauen und der akrosomalen bzw. der Plasmamembranintegrität, verglichen mit der Kryokonservierung unmittelbar nach der Spermagewinnung. Für diese Vorgehensweise ist der Uppsala Equex-2-Verdünner besser geeignet als der TRIS-Eigelb-Verdünner (Hermansson und Linde-Forsberg, 2006).

2.4.2 Kryokonservierung

Bedingt durch die Lagerung in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von - 196°C, wird der Stoffwechsel der Samenzellen stillgelegt, wodurch diese in den Zustand der Anabiose eintreten (Hoffmann, 2003d) und nahezu unbegrenzt lagerbar werden (England und Millar, 2008). Dadurch ermöglicht die Kryokonservierung den internationalen Handel mit Sperma und es können

Samenbanken von Rüden herausragenden genetischen Wertes errichtet werden (Peña et al., 2006).

Für die Kryokonservierung ist die Qualität des Ausgangsmaterials noch entscheidender als bei der Flüssigkonservierung. Es sollten nur Ejakulate verwendet werden, die in allen Parametern den geforderten Ansprüchen (siehe Tab. 2) genügen (Pesch et al., 2007). Das Sperma mancher Rüden lässt sich besser tiefgefrieren als das anderer Rüden (Seager und Fletcher, 1973; Eilts, 2005b; Farstad, 2009), was auf genetische Unterschiede bezüglich der Zusammensetzung der zellulären Membranen zurückzuführen sein könnte, welche in einer unterschiedlichen Wasserpermeabilität der Zellmembranen resultieren (Eilts, 2005b). Individuelle Unterschiede hinsichtlich der Gefriertauglichkeit sind auch von anderen Haustierspezies und vom Menschen bekannt (Seager und Fletcher, 1973).

Da Hundesperma physiologischerweise weniger konzentriert ist als z. B. Wiederkäuersperma, wird es vor der Weiterverarbeitung häufig zentrifugiert und das gewonnene Pellet nach Verwerfung des Überstandes in Abhängigkeit von der enthaltenen Spermienzahl mit einem Verdünner resuspendiert (Günzel, 1986). Die Verdünner für die Kryokonservierung ähneln in ihrer Zusammensetzung denen für die Flüssigkonservierung (Concannon und Battista, 1989; Pesch et al., 2007), enthalten aber immer zusätzlich ein Kryoprotektivum (Linde-Forsberg, 1991; Pesch et al., 2007). Üblicherweise setzen sich Verdünner für die Kryokonservierung von Hundesperma aus TRIS als Puffersubstanz, Zitronensäure, Glukose oder Fruktose als Energiequelle, Eigelb als Membranprotektivum und Glycerol als Kryoprotektivum zusammen (Peña et al., 2006), wobei gerade der Zusatz eines Kryoprotektivums essentiell ist (Linde-Forsberg, 1991; Pesch et al., 2007).

Die Aufarbeitung kann nach einer Vielzahl ein- oder zweistufiger (Zugabe von zwei verschiedenen Verdünnern mit zwischenzeitlicher Äquilibrierung) Protokolle erfolgen; allen gemeinsam ist eine initiale Abkühlung auf 4°C bzw. 5°C, bevor das Sperma zunächst über Stickstoffdampf und dann in flüssigem Stickstoff gelagert wird (Gill et al., 1970; Silva und Verstegen, 1995; England und Ponzio, 1996; Linde-Forsberg et al., 1999; Rota et al., 1999a; Peña und Linde-Forsberg, 2000; Linde-Forsberg, 2001; Eilts, 2005b; Hermansson und Linde-Forsberg, 2006; Martins-Bessa et al., 2006; Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007). Hinsichtlich der Konfektionierung werden Glasampullen, Röhrchen mit einem Volumen von

0,25 bis 1 ml und Pellets unterschieden (Seager und Platz, 1977a; Günzel, 1986). Üblicherweise werden 0,5 ml-Pailletten, welche auch als Midi-Pailletten (Minitüb, 84184 Tiefenbach, Deutschland) bezeichnet werden, verwendet (Andersen, 1980; Linde-Forsberg, 1991; Pesch et al., 2007).
Nach frühestens zwölf Stunden sollte von jeder einzelnen Charge eine Samenprobe auf ihre Qualität untersucht werden. Dazu wird eine Paillette im Wasserbad bei 37°C über 20 Sekunden aufgetaut und direkt im Anschluss werden die in Tab. 2 genannten Parameter bewertet. Der prozentuale Verlust an vorwärtsbeweglichen Samenzellen sollte 20 % nicht überschreiten (Pesch et al., 2007). Der Anteil an morphologisch veränderten Spermien kann durch das Auftreten zusätzlicher tertiärer Veränderungen, welche insbesondere lose Köpfe darstellen, bis auf 30 % erhöht sein (Hoffmann, 2003d). Generell sollte das Sperma immer in der Weise aufgetaut werden, wie sie von der herstellenden Person empfohlen wird, da die Methode des Auftauens von der Methode des Einfrierens abhängig ist. Schnelles Einfrieren erfordert schnelles Auftauen und umgekehrt (Linde-Forsberg, 1991).

2.4.3 Vergleich von Flüssig- und Kryokonservierung

Das gesteigerte Interesse an flüssigkonserviertem Sperma ist auf die besseren Erfolgsraten der KB mit flüssigkonserviertem Sperma im Vergleich zu gefrorenem Sperma zurückzuführen (Concannon und Battista, 1989) (siehe Tab. 1, Kap. 2.1.4). Gründe hierfür sind: 1) Schädigungen durch Kryokonservierung entfallen (Concannon und Battista, 1989), 2) die Zervix stellt eine kleinere Barriere dar (Concannon und Battista, 1989), da flüssigkonservierte Samenzellen eine ausreichend hohe Motilität zur Überwindung der Zervixbarriere aufweisen (Pesch et al., 2007), 3) die Anzahl an zu inseminierenden Spermien ist i. d. R. höher (Concannon und Battista, 1989) und 4) die Lebensdauer der Spermien im Reproduktionstrakt der Hündin ist länger, wodurch die Notwendigkeit einer präzisen Bestimmung des Besamungszeitpunktes weniger kritisch ist als bei TG-Sperma (Concannon und Battista, 1989; Pinto et al., 1999).
Gerade bei Kurzzeitlagerung ist flüssigkonserviertes Sperma kryokonserviertem Sperma stets deutlich überlegen. Die durchschnittliche Zeit, die es dauert, bis die Qualität von flüssigkonserviertem Sperma der von kryokonserviertem entspricht, beträgt im Mittel circa 118,7 ± 25,9 Stunden. Sollte die angestrebte

Lagerungsdauer diese Zeitspanne von 4,9 Tagen überschreiten, so ist eine Kryokonservierung des Spermas vorzuziehen (England und Ponzio, 1996).
Auf die Vorteile der Flüssigkonservierung hinsichtlich Herstellung und Versand wurde bereits zuvor hingewiesen (Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005; Peña et al., 2006; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007). Häufig sind auch die rechtlichen Bestimmungen für Import und Export weniger kompliziert als die für gefrorenes Sperma (Ponglowhapan et al., 2004).
Nachteilig bei flüssigkonserviertem Sperma ist neben der begrenzten Lebensdauer der konservierten Samenzellen (England und Ponzio, 1996; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007; Niżański, 2009) vor allem der organisatorische Aufwand (Linde-Forsberg, 1991). So müssen kurzfristig der Rüdenbesitzer, der die Spermagewinnung durchführende Tierarzt, der Hündinnenbesitzer und der die KB ausführende Tierarzt verfügbar sein (Linde-Forsberg, 1991).
Ein entscheidender Vorteil der Kryo- gegenüber der Flüssigkonservierung ist darin zu sehen, dass durch das Tiefgefrieren von Sperma die Möglichkeit der Konservierung und Lagerung wertvoller Gene männlicher Tiere in Form von Samenbanken für nahezu unendliche Zeit besteht (Linde-Forsberg, 1991; Peña et al., 2006; England und Millar, 2008).
Nachteilig an der Kryokonservierung ist der erhöhte materielle und personelle Aufwand, der die Durchführung der Kryokonservierung auf eine limitierte Anzahl an Tierärzten begrenzt (Linde-Forsberg, 1991). Die Tatsache, dass kryokonservierter Samen in flüssigem Stickstoff als Gefahrengut transportiert werden muss, kann durch Nutzung eines sogenannten Dry-Shippers, dessen Containerwände den Stickstoff absorbieren und so ein Austreten unmöglich machen, umgangen werden (Linde-Forsberg, 1991). Ein weiterer Nachteil ist, dass die Besamungstechnik, die bei gefrorenem Samen angewendet wird, wesentlich schwieriger ist als die, die bei frischem Samen genutzt wird (Linde-Forsberg, 1991).
Zusammenfassend ist die Verwendung von flüssigkonserviertem Sperma i. d. R. die Methode der Wahl, da sie einfacher und günstiger ist und bessere Ergebnisse liefert (Linde-Forsberg, 1991). Mit guter Planung, die bereits dann beginnen sollte, wenn die Hündin in den Östrus kommt, sollte das Problem der Organisation der Spermagewinnung und des Samentransportes nicht allzu schwierig zu überwinden sein (Linde-Forsberg, 1991). Im Gegensatz dazu sollte TG-Sperma empfohlen

werden, wenn lange Transportzeiten zu erwarten sind, Sperma für mehrere Hündinnen gefragt ist, die Personen, die in den Prozess involviert sind, am geeigneten Tag für die Besamung einer bestimmten Hündin nicht greifbar sind und natürlich wenn eine Sameneinlagerung für einen zukünftigen Gebrauch angestrebt wird (Linde-Forsberg, 1991).

2.5 Verdünner zur Flüssigkonservierung von caninem Sperma

Durch die Zugabe eines geeigneten Verdünners zum Ejakulat kann die Lebensdauer der Samenzellen verlängert werden (Hoffmann, 2003d). Der Verdünner stabilisiert die Zellmembran (Eilts, 2005b), wodurch diese vor Schädigungen durch Temperaturveränderungen und Erschütterungen beim Transport geschützt wird (Linde-Forsberg, 1995). Gleichzeitig stellt er Energie bereit und hält den pH-Wert sowie den osmotischen Druck konstant (Linde-Forsberg, 1995; Farstad, 1996). Üblicherweise finden als Verdünnerbestandteile Nähr-, Puffer- und Schutzsubstanzen Verwendung (Günzel, 1986).

Die beste Methode, um die Eignung von Verdünnern für die Spermakonservierung zu bewerten, ist der Vergleich der Konzeptionsraten nach KB. Allerdings ist dies unter experimentellen Bedingungen bei Hunden üblicherweise nicht möglich; deshalb werden für die Befruchtungsfähigkeit wichtige Spermienmerkmale wie Motilität, Membranstatus und akrosomale Integrität nach längerer Lagerungsdauer untersucht (Rota et al., 1995), wobei insbesondere die geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit seit langer Zeit zur Beurteilung der Verdünnerqualität herangezogen wird (Schäfer et al., 1997). Durch Kombination von zwei oder mehrerer dieser Tests sollte es möglich sein, eine signifikante Korrelation mit der Fertilität zu erreichen (Rota et al., 1995).

2.5.1 Anforderungen an einen Verdünner

Folgende Ansprüche werden an einen Verdünner für die Spermakonservierung gestellt:

- Bereitstellung von Nährstoffen als Energiequelle (Concannon und Battista, 1989; Hoffmann, 2003d)
- ausreichende Pufferkapazität (Concannon und Battista, 1989; Weitze, 2001; Hoffmann, 2003d) gegenüber aeroben und anaeroben toxischen

Abbauprodukten der Spermien (Weitze, 2001) in einem pH-Wert-Bereich von 6,0-7,0 (Weitze, 2001; Hoffmann, 2003d), wobei gewöhnlich ein pH-Wert von 6,5-6,6 (Foote und Leonard, 1964; Hoffmann, 2003d) angestrebt wird; bei pH-Werten > 7,0 erhöht sich die Stoffwechselaktivität der Samenzellen, was mit einem raschen Verlust der Energiereserven verbunden ist; bei pH-Werten < 5,2 kommt es zu einer deutlichen Minderung der Motilität (Hoffmann, 2003d)

- Isotonie zum Seminalplasma (250-300 mosm/l) (Farstad, 1996; Hoffmann, 2003d), um einen physiologischen osmotischen Druck bzw. das osmotische Gleichgewicht aufrechtzuerhalten (Concannon und Battista, 1989; Hoffmann, 2003d); isotone und leicht hypertone Verdünnermedien bieten bessere Konservierungsbedingungen als hypotone Medien mit gleicher Zusammensetzung (Wales und White, 1958; Weitze und Petrunkina, 2007)
- physiologische Elektrolytkonzentration (Concannon und Battista, 1989)
- Schutz der Samenzellen vor einem Kälteschock während des Kühlungsprozesses (Concannon und Battista, 1989) durch Schutzkolloide (Hoffmann, 2003d); dieser Zusatz ist bei Langzeitkonservierung oder im Rahmen der Flüssigkonservierung bei 4°C notwendig und hat zum Ziel, Schäden an der Spermienmembran durch den Aufbereitungsprozess weitestgehend zu vermeiden (Hoffmann, 2003d)
- Vermeidung von Gefrierschädigungen der Samenzellen bei der Langzeitkonservierung durch den Zusatz von Kryoprotektiva (Concannon und Battista, 1989; Hoffmann, 2003d)
- Verhinderung des Wachstums von Bakterien (Concannon und Battista, 1989) durch den Zusatz von Antibiotika (Hoffmann, 2003d)
- Verhütung von akrosomalen Veränderungen; dabei sollte die Fähigkeit der Spermien, zum geeigneten Zeitpunkt eine physiologische AR zu durchlaufen, erhalten bleiben; die Konzentrationen von Ca^{2+} und anderer Komponenten des Verdünnermediums beeinflussen den akrosomalen Status; hohe Ca^{2+}-Konzentrationen fördern die AR, niedrige hemmen sie (Sirivaidyapong et al., 2000).

2.5.2 Inhaltsstoffe

2.5.2.1 Zuckerkomponenten

Zuckerkomponenten gehören zu den Hauptbestandteilen von Verdünnern zur Spermakonservierung (Ponglowhapan et al., 2004) und erfüllen verschiedene Funktionen: In glykolisierbarer Form (Glukose, Fruktose, Mannose oder Arabinose) dienen sie den Spermien als Energiesubstrat (Weitze, 2001), indem sie in Glykolyse und Krebszyklus verstoffwechselt werden (Rigau et al., 2001). Außerdem werden sie in Form von Glykogen gespeichert, um eine mittel- bis langfristige Energiereserve für die Erhaltung der Motilität aufzubauen, für den Fall, dass keine externen Energiequellen verfügbar sind (Rigau et al., 2001). Des Weiteren tragen die Zuckerkomponenten wesentlich zur Osmolarität des Verdünnermediums bei (Weitze, 2001). Der letztgenannte Punkt ist abhängig von der Fähigkeit der Zucker, die Zellmembran zu durchdringen, welche wiederum temperaturabhängig ist. Aus diesem Grund werden einige Zucker bei höheren, andere bei tieferen Temperaturen bevorzugt (z. B. sind Glukose, Fruktose, Mannose und Sukrose zur Konservierung von Schafspermien besser geeignet bei 37°C, hingegen Ribose, Xylose, Arabinose und Galaktose bei 5°C) (Weitze, 2001). Weiterhin können Zucker eine kryoprotektive Wirkung entfalten (Weitze, 2001).

Der wichtigste Effekt von Zuckerkomponenten in Verdünnern zur Flüssigkonservierung ist die Aufrechterhaltung der Spermienmotilität (Ponglowhapan et al., 2004). Zucker sind als externe Energiequelle essentiell für die Erhaltung der Motilität, weshalb die Motilität einen bedeutenden Indikator für die Zuckernutzung durch die Spermien darstellt (Ponglowhapan et al., 2004). Werden Spermien in Abwesenheit jeglicher externer Energiequellen inkubiert, so können sie ihre Motilität bis zu 60 Minuten erhalten, wobei sich allerdings die Motilitätsmuster verändern. Die interne Energiequelle, die dabei genutzt wird, könnte Glykogen sein, welches in caninen Spermien in erheblichen Mengen vorhanden ist (Rigau et al., 2001). Zuckerzusatz in Form von Glukose (1 %) zu einem Eigelb-Zitrat-Glycin-Verdünner erhöht die Motilität nach einer Lagerungsdauer von 13 Tagen signifikant, verglichen mit einer Kontrolle ohne Glukose (40 % versus 28 %) (Foote und Leonard, 1964). In Verdünnern mit Zuckerzusatz in einer Konzentration von 70 mM sind die durchschnittliche Gesamtmotilität, der Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien und die Werte des Motilitätsparameters VAP signifikant erhöht und es können Werte von ≥ 70 % Gesamtmotilität über eine

Lagerungsdauer von bis zu acht Tagen aufrechterhalten werden (Ponglowhapan et al., 2004). Die mittleren Werte für VAP, VSL und VCL steigen im Vergleich zu frischem Sperma in der ersten Lagerungsperiode nach Verdünnung signifikant an, was darauf hindeutet, dass Zuckerzusätze in Verdünnern die Spermiengeschwindigkeit anregen (Ponglowhapan et al., 2004).
Canines Sperma ist durch eine sehr niedrige Fruktosekonzentration charakterisiert; trotzdem können Hundespermien zugesetzte Fruktose unter anaeroben Bedingungen in gleichem Ausmaß nutzen wie Spermien von Spezies, die ein fruktosereiches Ejakulat produzieren (Bartlett, 1962b).
Generell können als Zuckerkomponenten Fruktose, Galaktose, Glukose, Xylose (Monosaccharide), Laktose, Trehalose, Maltose, Sukrose (Disaccharide) oder Raffinose (Trisaccharid) eingesetzt werden (Yildiz et al., 2000).
Die am häufigsten genutzten Zucker in Verdünnern für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma sind Glukose und Fruktose, welche von frisch ejakulierten Hundespermien in separaten Stoffwechselwegen metabolisiert werden (Ponglowhapan et al., 2004). Letzteres bedingt, dass sich die Effekte von Glukose und Fruktose auf den Energiestatus der Zellen voneinander unterscheiden, wodurch gleichzeitig die Motilitätsmuster verschieden sind. Fruktose führt zu einem schnelleren und mehr linearen Bewegungsmuster, während Glukose eine mehr oszillatorische Bewegung verursacht. Allerdings wird weder durch Fruktose noch durch Glukose der Prozentsatz an motilen Spermien verändert (Rigau et al., 2001). Welcher Zucker (Fruktose oder Glukose) als Energiezusatz besser geeignet ist, wird kontrovers diskutiert (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Ponglowhapan et al., 2004). Allerdings ist der Glukoseverbrauch stets höher als der Fruktoseverbrauch, wenn beide Zucker in gleichen Mengen vorhanden sind (Ponglowhapan et al., 2004), was darauf hindeutet, dass Hundespermien vorzugsweise Glukose nutzen (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Ponglowhapan et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für die Präferenz von Glukose könnte die höhere Kapazität an Glukosetransportsystemen sein (Ponglowhapan et al., 2004). Untersuchungen beim Mann ergaben sogar, dass humane Spermien Glukose im Seminalplasma selbst dann bevorzugt verwenden, wenn die Fruktosekonzentration 50-fach höher ist (Martikainen et al., 1980).
In einer vergleichenden Untersuchung verschiedener Zuckerzusätze (70 mM) zu einem TRIS-Zitrat-Verdünner mit 8 % Glycerol und 20 % Eigelb hinsichtlich ihres Einflusses auf Motilität, Viabilität und akrosomale Integrität während Verdünnung,

Äquilibrierung und Kryokonservierung konnten Yildiz et al. (2000) feststellen, dass die verwendete Zuckerart die genannten Parameter während der Äquilibrierung und der Kryokonservierung signifikant beeinflusst. So reduziert der Zusatz von Galaktose, Laktose, Trehalose, Maltose und Sukrose bei äquilibrierten Proben signifikant den Prozentsatz geschädigter Akrosome. Disaccharidzusatz (mit Ausnahme von Laktose) vermindert den Anteil an toten Spermien nach dem Auftauen und/oder den Prozentsatz geschädigter Akrosome ohne die Motilität nach dem Auftauen zu fördern, wohingegen der Zusatz von Monosacchariden, insbesondere Fruktose und Xylose, Motilität, Viabilität und akrosomale Integrität nach dem Auftauen verbessert (Yildiz et al., 2000).

Die Zuckerkomponenten werden vermutlich in Milchsäure umgewandelt, was einen stärkeren Abfall des pH-Wertes während der Lagerung bedingt (Foote, 1964b).

Die eingesetzten Monosaccharidkonzentrationen in den gebräuchlichen Verdünnern für die Flüssigkonservierung von Hundesperma reichen von 5 bis 120 mM (Foote, 1964a; Gill et al., 1970; Province et al., 1984; Rota et al., 1995; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005). Ponglowhapan et al. (2004) konnten eine Überlegenheit höherer Konzentrationen (70 mM) gegenüber niedrigen (10 mM) feststellen. Sie sehen einen TRIS-Eigelb-Verdünner mit einer Fruktosekonzentration von 70 mM als am geeignetsten für die Langzeitkonservierung von Flüssigsperma an. Abweichend davon sind Rigau et al. (2001) der Ansicht, dass der Einsatz hoher Zuckerkonzentrationen die Konservierung nicht begünstigen kann, da die Samenzellen einer Umgebung ausgesetzt werden, welche ihre Energie-gewinnenden Mechanismen sättigt. Deshalb könnten niedrigere Zuckerkonzentrationen positivere Effekte ausüben, weil sie zu einem physiologischeren Energiestatus der Hundespermien führen (Rigau et al., 2001).

2.5.2.2 Puffer

Hundespermien sind in einem pH-Bereich von 5,0 bis 10,0 beweglich, mit einem pH-Optimum zwischen 7,0 und 8,5, innerhalb dessen sie maximale Motilität zeigen (Wales und White, 1958). Die metabolische Aktivität der Samenzellen resultiert in einer Anhäufung von Wasserstoffionen. Gibt es keine Mechanismen für die Entfernung dieser Ionen, so sinkt der pH-Wert des Verdünners, was eine Reduktion der Langlebigkeit der Spermien und ihrer Fertilität zur Folge hat. Um

dies zu vermeiden, kommen Puffersysteme zum Einsatz (England, 1993). Dabei können Puffer entweder in geringer Konzentration zur Aufrechterhaltung eines bestimmten pH-Wertes oder als Hauptkomponente des Verdünners (Zitrat, TRIS) verwendet werden, um Tonizität und Pufferkapazität zu gewährleisten (Weitze, 2001). Die meisten Verdünner puffern in einem pH-Wert-Bereich von 6,9 bis 7,1 (England, 1993).

Beispielsweise werden Bikarbonat und Zitrat, welche dem Verdünner in Form von Natriumbikarbonat und/oder Natriumzitrat zugesetzt werden, als Puffer verwendet (Weitze und Petrunkina, 2007). Beim Vergleich von Zitrat-, Phosphat- und Glycin-Puffer, stellte sich der Zitrat-Puffer (Natriumzitrat) als überlegen dar, wobei Konzentrationen von 1,16 % oder 1,45 % Natriumzitrat besser geeignet waren als niedrigere Konzentrationen (Foote und Leonard, 1964).

Neuere Verdünner basieren auf organischen Zwitterionen-Puffern (England, 1993; Weitze, 2001; Weitze und Petrunkina, 2007), wie TES und HEPES, die Schwermetalle binden und den pH-Wert kontrollieren (Weitze und Petrunkina, 2007). Auch die Verwendung von TRIS eröffnete neue Möglichkeiten (Weitze, 2001). Nachteilig an TRIS ist jedoch, dass es bei einem pH-Wert von 7,0 nur eine relativ geringe Pufferkapazität besitzt (England, 1993; Weitze, 2001), während TES und HEPES bei 20°C einen pK-Wert von 7,15-7,55 aufweisen (Weitze, 2001). Die Puffersubstanzen müssen vor der Verwendung mit Alkali oder Säure auf den entsprechenden pH-Wert titriert werden; TRIS-HCl, TRIS-Zitronensäure oder TES-TRIS sind oder waren wichtige Kombinationen (Weitze, 2001).

Des Weiteren haben auch Proteine frischer oder gefriergetrockneter Magermilch eine zufriedenstellende Pufferkapazität. Ihr Gebrauch beschränkt sich allerdings auf die Tierarten Schaf, Ziege und Pferd (Weitze, 2001).

2.5.2.3 Membranprotektiva

Die Spermienplasmamembran reagiert auf Temperaturschwankungen durch Änderungen ihres physikalischen Status. Innerhalb eines Temperaturbereiches von ca. 17 bis 36°C können Temperaturschwankungen im Hinblick auf die Intaktheit der Plasmamembran aufgefangen werden. Bei weiter abfallenden Temperaturen treten Plasmamembranschäden auf, welche sich in Kühl- und Gefrierschäden unterteilen lassen (Hoffmann, 2003d).

Die Kühlschäden ergeben sich aus dem sog. „Kälteschock“ (Watson und Morris, 1987; Weitze, 2001; Hoffmann, 2003d) bzw. „Kühlschock“ (Weitze und Petrunkina,

2007), einem Phänomen, welches bei Temperaturabsenkungen in den Bereich von ca. + 17 bis + 4°C eintritt (Hoffmann, 2003d). Als primäre Ursache hierfür werden Fluiditätsveränderungen in der Plasmamembran verantwortlich gemacht (Hoffmann, 2003d), welche durch eine Veränderung der Lipidzusammensetzung des Membranbilayers entstehen (Hammerstedt et al., 1990; Weitze und Petrunkina, 2007). Eine Temperaturerniedrigung fördert die Verschiebung von einer Flüssigphase zu einem Gelzustand (Hammerstedt et al., 1990; Hoffmann, 2003d; Weitze und Petrunkina, 2007) durch Verminderung der Lateralbewegung von Membranphospholipiden (Weitze und Petrunkina, 2007) bzw. durch Zusammenlagerung von nicht-bilayer Lipiden (Hammerstedt et al., 1990). Die Membranen verlieren ihre selektive Permeabilität, was in einer Freisetzung vieler zellulärer Komponenten (Lipide, Proteine, Ionen) resultiert und zusätzlich den Einstrom von Natrium- und Calciumionen in das Zellinnere ermöglicht. In Folge nimmt die metabolische Aktivität ab und weitere sekundäre Veränderungen entstehen (Watson und Morris, 1987). Die Viabilität von Zellen nach einer Temperaturveränderung ist von der Schnelligkeit der Temperaturerniedrigung, der finalen Temperatur und der Zeitdauer der Inkubation bei reduzierter Temperatur vor der Wiedererwärmung abhängig; mit zunehmender Inkubationszeit steigt der Verlust an Viabilität (Watson und Morris, 1987).

Der Kälteschock ist je nach Spezies verschieden ausgeprägt (Weitze, 2001; Hoffmann, 2003d); Hundespermien reagieren relativ unempfindlich, während beispielsweise Schweinespermien sehr empfindlich sind (Hoffmann, 2003d). Wichtige Effekte des Kälteschocks sind: Verminderung der Motilität (Weitze und Petrunkina, 2007), Freisetzung von Enzymen (Watson und Morris, 1987; Weitze und Petrunkina, 2007), Ionentransporte über die Membran (Watson und Morris, 1987; Weitze und Petrunkina, 2007) und Verlust von Membranlipiden (Weitze und Petrunkina, 2007). Die Membranpermeabilität wird erhöht, sodass Phasenveränderungen und der damit verbundene Einstrom von freien Ca^{2+}-Ionen aus der Umgebung in die Zelle calciumabhängige Vorgänge auslösen, die zu kapazitationsähnlichen Phänomenen führen (kühlabhängige „Kapazitierung“; Weitze, 2001), die Zellmembran fusiogener und somit instabiler machen (Weitze und Petrunkina, 2007) und damit die Überlebensfähigkeit der Samenzellen im Hinblick auf ihre Befruchtungsfähigkeit begrenzen (Weitze, 2001). Ein großer Anteil der Spermien zeigt nach einem Kälteschock geschädigte akrosomale Membranen (Watson und Morris, 1987).

Unreife Spermien aus den oberen oder mittleren Regionen des Epididymis sind weitaus weniger empfindlich gegenüber Kälteschockschäden, was auf die sich ändernde Lipidzusammensetzung der Membranen während der Spermienreifung zurückzuführen sein könnte (Watson und Morris, 1987).

2.5.2.3.1 Eigelb

Um die durch das Phänomen des „Kälteschocks“ induzierten Schäden an der Plasmamembran möglichst gering zu halten, hat sich der Zusatz von Eigelb zum Verdünner als Schutzkolloid über alle Spezies hinweg bewährt (Hoffmann, 2003d) und ist weitverbreitet (Beccaglia et al., 2009a; Farstad, 2009). Die Mehrheit der Verdünner enthält Eigelb als Haupt-Membranprotektivum (Kmenta et al., 2011).
Eigelb ist keine definierte Substanz, sondern ein komplexes biologisches Produkt (Beccaglia et al., 2009a; Farstad, 2009), welches durch eine extrem hohe Variabilität in seiner Zusammensetzung gekennzeichnet ist (Bergeron und Manjunath, 2006; Beccaglia et al., 2009a). Es enthält Proteine, Vitamine, Phospholipide, Glukose, antibakterielle Stoffe und Antioxidantien, welche alle potentiell nützlich für die Integrität der Zellmembran sind (Farstad, 2009). Eigelb ist eine Quelle für Lipoproteine und Komponenten mit hohem Molekulargewicht (Beccaglia et al., 2009a), welche die Samenzellen bzw. deren Zellmembranen gegen einen Kälteschock schützen (Beccaglia et al., 2009a; Farstad, 2009) bzw. diesen reduzieren (Concannon und Battista, 1989). Die Antioxidantien schützen die Zellen vor oxidativen Schädigungen durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Farstad, 2009).
Die Mechanismen, durch die das Eigelb den Schutz gegen Kälteschockschäden vermittelt, sind nicht genau bekannt (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b). Es wird angenommen, dass die aktiven Schutzkomponenten des Eigelbs die Phospholipide einer Low-density-Lipoprotein (LDL)-Fraktion sind (Watson und Morris, 1987; Weitze und Petrunkina, 2007), wobei insbesondere dem Phosphatidylcholin eine große Bedeutung zukommt (Watson und Morris, 1987). Eine mögliche Erklärung ist, dass diese Phospholipide an die Spermienmembran binden und so deren Schutz bewirken (Weitze und Petrunkina, 2007). Phosphatidylcholin scheint seine Wirkung über eine Membranstabilisierung auszuüben, wobei es die Membranzusammensetzung allerdings nicht permanent modifiziert (Watson und Morris, 1987). Weiterhin könnten die Phospholipide den

Phospholipidverlust aus der Membran verhindern oder die bereits verloren gegangenen Phospholipide ersetzen (Farstad, 2009).
Ein anderer Erklärungsansatz wird von Bergeron und Manjunath (2006) postuliert: LDL im Eigelb schützt beim Bullen die Spermienfunktion, indem es die Bindung der Spermien an die Hauptseminalplasmaproteine und dadurch gleichzeitig die von letzteren modulierte Stimulation des Lipidverlustes aus der Plasmamembran verhindert. LDL bildet dabei mit den Seminalplasmaproteinen stabile Komplexe, wobei seine Bindungskapazität sehr hoch ist. Da diese Seminalplasmaproteine bei Säugern ubiquitär vorkommen und homologe Proteine ebenfalls an LDL binden, könnten auch die Mechanismen der protektiven Funktion von Eigelb bei allen Säugern die gleichen sein (Bergeron und Manjunath, 2006).
Iguer-Ouada und Verstegen (2001b) konnten zeigen, dass Eigelb einen positiven Effekt auf die Konservierung der Spermienmotilität sowie einen schützenden Effekt gegen spontane AR besitzt bzw. die akrosomale Integrität positiv beeinflusst. Die Stabilisierung des Akrosoms könnte durch einen direkten schützenden Effekt auf die akrosomale Membran vermittelt werden (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b).
Während einer viertägigen Lagerung von flüssigkonserviertem Sperma bei 5°C steigt der Prozentsatz kapazitierter Spermien signifikant an, wenn ein TRIS-Zitronensäure-Fruktose-Verdünner ohne Eigelbzusatz verwendet wird, verglichen mit der Konservierung in demselben Verdünner mit Eigelbzusatz (Schäfer-Somi, 2009). Daher wird angenommen, dass Eigelb die hauptsächliche Komponente für die Verhinderung der Kapazitation ist (Schäfer-Somi, 2009; Witte et al., 2009), weshalb es in Verdünnern für die Flüssigkonservierung immer enthalten sein sollte (Schäfer-Somi, 2009).
Für die Konservierung von Hundesperma wurden bisher verschiedene Eigelbkonzentrationen eingesetzt (England, 1993), wobei die üblichen Konzentrationen zwischen 15 und 30 % Vol. liegen (Weitze und Petrunkina, 2007); Konzentrationen darunter oder darüber führen zu einer Verringerung des Anteils motiler Spermien (Weitze und Petrunkina, 2007). Auch Foote und Leonard (1964) konnten eine Überlegenheit von 20 % Eigelbzusatz gegenüber 50 % zeigen.
Das Eigelb sollte vorsichtig vom Eiweiß getrennt werden, indem es auf ein Filterpapier gegeben und so lange behutsam abgerollt wird, bis das Eiweiß sich abgelöst hat. Um das genaue Volumen an Eigelb zu bestimmen, kann eine Einwegspritze verwendet werden (Linde-Forsberg, 1991).

Unglücklicherweise ist Eigelb ein biologisch riskantes Produkt tierischen Ursprungs (Bergeron und Manjunath, 2006; Farstad, 2009), dem ein potentielles Risiko mikrobieller Kontamination innewohnt (Hoffmann, 2003d; Bergeron und Manjunath, 2006; Beccaglia et al., 2009b), welche für eine anschließende Endotoxinproduktion mit Schädigung der Befruchtungsfähigkeit der Spermien verantwortlich sein kann (Beccaglia et al., 2009a) und wodurch die Möglichkeit einer Krankheitsübertragung besteht (Farstad, 1996; Beccaglia et al., 2009a). Dies kann insbesondere beim internationalen Handel mit Sperma ein Problem darstellen (Farstad, 1996; Beccaglia et al., 2009b), weshalb Eigelb von spezifisch pathogenfreien Hühnern (Farstad, 1996) oder aus Eigelb gewonnene Phospholipide oder Lecithin zum Ersatz genutzt werden (Farstad, 2009; Schäfer-Somi, 2009).

Varela Junior et al. (2009) setzten aus Hühnereiern gewonnenes, gereinigtes LDL bei der Konservierung von Hundesperma ein und konnten zeigen, dass LDL in einem TRIS-Glukose-Verdünner das Eigelb ersetzen kann und es dadurch zu einer Verbesserung der Spermienmotilität und der Membranintegrität kommt. Dabei konnte kein signifikanter Effekt der LDL-Konzentration beobachtet werden; sogar die geringste getestete Konzentration (6 %) schützt flüssigkonserviertes Hundesperma gegen einen Kälteschock. Allerdings deuten die Ergebnisse der Studie darauf hin, dass LDL in einer Konzentration von 8 % am wirksamsten ist.

Eine weitere Alternative zu Eigelb, die frei von tierischen Eiweißen ist, ist die Verwendung von Sojabohnen-Lecithin (Beccaglia et al., 2009a; Schäfer-Somi, 2009; Kmenta et al., 2011) in einer Konzentration von 0,04 % (Beccaglia et al., 2009a) bzw. 0,8 % (Kmenta et al., 2011) in einem TRIS-Verdünner.

Nachteilig an der Verwendung von Eigelb als Verdünnerbestandteil ist, dass Eier relativ teuer sind und ihre Handhabung bei der Herstellung des Verdünners mühsam und zeitaufwändig ist (Thacker und Almquist, 1953). Weiterhin ist zu beachten, dass Eigelb Partikel enthält, die in ihrer Größe ähnlich den Dimensionen der Spermienköpfe sind, was bei Anwendung von CASA-Systemen zu einer Überschätzung des Anteils an immotilen Spermien führen kann. Um dies zu vermeiden, sollte der Verdünner durch Zentrifugation bei 3,310 x g für 20 Minuten von den Partikeln befreit werden (Ponglowhapan et al., 2004).

2.5.2.3.2 Milch

Milch enthält ebenfalls Faktoren, die fähig sind, die Bindung der Seminalplasmaproteine an Bullenspermien zu verhindern und so den Lipidverlust aus der Membran zu reduzieren. Da aber auch Magermilch, die keine Lipide enthält, die Spermien schützt, scheinen andere Faktoren als Lipide oder Lipoproteine für den protektiven Effekt verantwortlich zu sein (Bergeron und Manjunath, 2006; Bergeron et al., 2007). Wahrscheinlich interagieren Caseine, die Hauptproteine der Milch, mit den Seminalplasmaproteinen (Bergeron und Manjunath, 2006; Bergeron et al., 2007). Während es sich bei der Bindung von LDL aus Eigelb an die Seminalplasmaproteine um eine Protein-Lipoprotein-Interaktion handelt, fangen in der Milch die Caseinmicellen die Seminalplasmaproteine ab, was eine Protein-Protein-Interaktion darstellt (Bergeron et al., 2007). Außerdem scheint auch Laktose in den Prozess der Spermienprotektion durch Milch involviert zu sein. Sie scheint die Effektivität des Verdünners zu verbessern, ist alleine aber nicht ausreichend zum Schutz der Spermien (Bergeron und Manjunath, 2006).

Wie Eigelb ist auch Milch ein Produkt tierischen Ursprungs, das in seiner Zusammensetzung nicht konstant ist und das potentielle Risiko einer Spermakontamination in sich birgt (Bergeron und Manjunath, 2006).

2.5.2.4 Kryoprotektiva

Der Zusatz von Kryoprotektiva zu Spermaverdünnern reduziert Gefrierschäden (Concannon und Battista, 1989) und verbessert so das Überleben der Samenzellen nach dem Einfrierprozess (England, 1993). Die Tiefgefrierung von Hundespermien in Abwesenheit eines Kryoprotektivums resultiert in einer starken Reduktion der Anzahl an überlebenden, motilen Spermien nach dem Auftauen (Concannon und Battista, 1989).

Kryoprotektive Substanzen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: 1) zellpenetrierende Substanzen, wie Glycerol, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Methanol und 2) die Zellmembran nicht penetrierende Substanzen, wie Proteine, verschiedene Zucker und Polyvinylpyrrolidone (England, 1993; Weitze, 2001).

Der Zusatz kryoprotektiver Agentien bringt die Zellen in Kontakt mit einer hypertonen Umgebung. Anfangs verursacht dies, dass die Zellen schrumpfen. Wenn das Kryoprotektivum dann aber in die Zellen eindringt, gewinnen sie ihr normales Volumen wieder. Beim Vorgang des Einfrierens schrumpfen die Zellen

erneut, während Wasser aus ihrem Inneren ausströmt und sich im extrazellulären Raum Eiskristalle bilden. Abhängig von der Kühlrate können sich auch innerhalb der Zellen Eiskristalle bilden. Intrazelluläre Eisbildung führt üblicherweise zu Schädigungen der Zellmembran, welche ihre semipermeablen Eigenschaften verliert, was wiederum zum Zelltod führt (Eilts, 2005b).

Glycerol ist das am häufigsten verwendete Kryoprotektivum für Hundesperma (Concannon und Battista, 1989; Martins-Bessa et al., 2006; Rota et al., 2006; Futino et al., 2010). Es handelt sich um ein intrazelluläres Kryoprotektivum (Silva et al., 2002), das den Gefrierpunkt in einer glycerolhaltigen Lösung herabsetzt, was zu höheren Anteilen der nichtgefrorenen Fraktion in der Lösung und zu einer niedrigeren Salzkonzentration führt (Weitze und Petrunkina, 2007). Glycerol vermindert Zellschäden, indem es die Hyperosmolarität im umgebenden Medium reduziert (Weitze und Petrunkina, 2007).
Trotz seiner protektiven Effekte kann Glycerol Veränderungen in der Lipidpackungsstruktur der Spermienmembran induzieren. Infolgedessen können sich Stabilität und Wasserpermeabilität der Zelle ändern, was zu einer reduzierten Lebensdauer der Spermien führen kann (Silva et al., 2006). Daher stellt die optimale Konzentration von Glycerol die Balance zwischen seinen toxischen und seinen schützenden Effekten dar (England, 1993). Beim Hund variieren die genutzten Glycerolkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Verdünners und dem verwendeten Puffer zwischen 1 und 16 % Vol. (Concannon und Battista, 1989; England, 1993; Farstad, 1996; Futino et al., 2010). Rohloff et al. (1978) konnten optimale Konzentrationen von 4 bis 8 % ermitteln. Rota et al. (1999a; 2006) verwenden eine Endkonzentration von 5 % Glycerol im Verdünner, Silva et al. (2006) 6 % und Tsutsui et al. (2000) 7 %. Nach Peña et al. (2006) tolerieren Hundespermien dagegen nur eine Glycerol-konzentration von 4-5 %. Province et al. (1984) konnten zeigen, dass ein Zusatz von 6 % Glycerol zum Verdünner die Motilität von flüssigkonservierten Hundespermien herabsetzt, während ein Zusatz von 3 % keine Auswirkungen auf die Motilität besitzt. Günzel-Apel et al. (1993) konnten ebenfalls eine abnehmende Tendenz der durchschnittlichen Bewegungsgeschwindigkeit der Spermien nach dem Zusatz von Glycerol beobachten und auch nach Foote und Leonard (1964) ist die Überlebensrate der Spermien in Verdünnern, die Glycerol enthalten, etwas geringer. Während kurzer Lagerungsperioden führen bis zu 8 % Glycerolzusatz zu

einem Eigelb-Zitrat-Glycin-Verdünner allerdings nur zu einer leichten Reduktion der Motilität (Foote und Leonard, 1964). Dennoch sprechen sich Province et al. (1984) gegen die Verwendung von Glycerol zur Flüssigkonservierung von Hundesperma aus, da der Zusatz von Glycerol keinen vorteilhaften Effekt auf die Motilität ausübt.

Neben Glycerol werden in der Literatur weitere Gefrierschutzsubstanzen wie DMSO (Rohloff et al., 1978), Ethylenglycol (Martins-Bessa et al., 2006; Rota et al., 2006; 2010) und Methylformamid bzw. Dimethylformamid (Lopes et al., 2009b; Futino et al., 2010) zur Kryokonservierung von Rüdensperma beschrieben. Da diese im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit nicht von Bedeutung sind, soll hier nicht weiter auf ihre Eignung eingegangen werden.

2.5.2.5 Antibiotika

Die Vermehrung von Bakterien ist im Verlauf der Konservierung ein zu beachtender Faktor, weshalb der Zusatz von Antibiotika zum Verdünner unerlässlich erscheint. Dieser Zusatz kann die Konservierung zweifellos noch verbessern (Brochart und Coulomb, 1952) und ist insbesondere bei der Flüssigkonservierung (Hoffmann, 2003d) bzw. bei der Verwendung von eigelbhaltigen Verdünnern angebracht, da Eigelb das bakterielle Wachstum begünstigt (Linde-Forsberg, 1995). Bei der Langzeitkonservierung, bei der mit der Vermehrung eventuell im Ejakulat vorhandener oder eingebrachter Keime nicht zu rechnen ist, könnte wahrscheinlich auf diesen Zusatz verzichtet werden (Hoffmann, 2003d). Zudem können Antibiotika möglicherweise die Verbreitung von Infektionen verhindern (Linde-Forsberg, 2001). I. d. R. werden den verschiedenen Verdünnern Penicillin und Streptomycin zugesetzt (Foote, 1964a; Foote und Leonard, 1964; Andersen, 1980; Concannon und Battista, 1989; Linde-Forsberg, 1995). Dieser Antibiotikazusatz ist für die Spermien nicht schädlich und hilft, das Wachstum kontaminierender Organismen zu kontrollieren (Foote und Leonard, 1964).

2.5.2.6 Sonstige Inhaltsstoffe

2.5.2.6.1 Antioxidantien

Samenzellen besitzen in ihrer Plasmamembran einen relativ hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, welche leicht oxidiert werden können,

wodurch die Samenzellen besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress sind (Beccaglia et al., 2009a; Michael et al., 2010). Hinzu kommt, dass die Samenzellen nur einen begrenzten Gehalt an Antioxidantien besitzen (Michael et al., 2010).
Im Ejakulat werden durch die Spermien selbst sowie durch enthaltene Leukozyten reaktive oxidative Substanzen (ROS) produziert (Griveau et al., 1995), welche in niedrigen Konzentrationen als Mediatoren der normalen Spermienfunktion agieren, während sie, wenn sie im Übermaß produziert werden, hoch toxisch für die Samenzellen sind (Michael et al., 2010). Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches durch spontane Dismutation aus Hyperoxidanionen (O_2^-) entsteht, scheint dabei aufgrund seiner Fähigkeit, Membranen frei zu überqueren und Enzymaktivitäten sowie zelluläre Funktionen zu hemmen, die toxischste Substanz zu sein (Griveau et al., 1995). Durch den Einfluss von ROS kommt es über die Peroxidation von Membranphospholipiden zu einer Erhöhung der Lipidhydroperoxidkonzentration, einer Verminderung der Fähigkeit zur Ionophor-induzierten AR, einer Reduktion der Motilität und einem Verlust von mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus der Membran (Griveau et al., 1995). Eine Inhibition des Energiemetabolismus durch H_2O_2 könnte die reversible Immobilisation der Samenzellen erklären (Griveau et al., 1995).
Um sich gegen Schädigungen durch ROS zu schützen, besitzen die Spermien folgende drei antioxidative enzymatische Systeme: Superoxiddismutase, Katalase und das Glutathionperoxidase/Reduktase-System (Griveau et al., 1995; Farstad, 2009). Diese Verteidigungssysteme kontrollieren in vivo das Gleichgewicht zwischen ROS-Produktion und -Neutralisierung (Farstad, 2009).
Während einer längeren Lagerung können die endogenen antioxidativen Kapazitäten des Spermas jedoch ungenügend sein (Ceylan und Serin, 2007). Ein Anstieg der Konzentration von ROS im Seminalplasma oder im Verdünner während der Lagerung ist verantwortlich für Zellmembranschäden und für die Verschlechterung der Spermaqualität (Beccaglia et al., 2009a). Zusätzlich können ROS indirekt oxidativen Stress verursachen, indem sie die enzymatische Abwehr der Samenzellen herabsetzen (Michael et al., 2010). Um den oxidativen Stress zu vermeiden und das Überleben und die funktionale Integrität der Samenzellen zu verbessern, sollte die Verwendung von Antioxidantien im Verdünner in Erwägung gezogen werden (Beccaglia et al., 2009a). Die Ergänzung des Verdünners mit bestimmten Antioxidantien kann, verglichen mit einer Kontrollgruppe, die

Spermaqualitätsparameter nach 24 und/oder 72 Stunden Lagerung signifikant verbessern (Michael et al., 2009).

Es wurde bereits eine Vielzahl an Substanzen bzw. Substanzkombinationen hinsichtlich ihrer antioxidativen Wirkung bei der Flüssigkonservierung von caninem Sperma getestet. Darunter die Thiole Cystein, N-Acetylcystein und Glutathion (Michael et al., 2009; 2010), die Vitamine Vitamin B16 (Pyridoxin) (Michael et al., 2009), Vitamin C (Ascorbinsäure) (Ceylan und Serin, 2007; Michael et al., 2008; 2009) und Vitamin E (α-Tocopherol) (Michael et al., 2009), das Enzym Katalase (Beccaglia et al., 2009a; Michael et al., 2009) und die Aminosulfonsäure Taurin (Michael et al., 2009).

Zusammenfassend zeigten von allen getesteten Antioxidantien Vitamin B16- und Vitamin E-Zusätze zu Verdünnern für die Flüssigkonservierung hinsichtlich der Erhaltung der Spermaqualität sowie der Hemmung von ROS die ausgeprägtesten positiven Effekte (Michael et al., 2009).

2.5.2.6.2 Natriumdodecyl(lauryl)sulfat (sodiumdodecyl(lauryl)sulfate, SDS)

SDS ist ein wasserlösliches, anionisches Detergens und Benetzungsmittel, das genutzt wird, um Proteine aufzuschließen (Rota et al., 1997). Es ist die aktive Komponente der Equex STM Paste (Nova Chemical Sales, Scituate, Inc., MA, USA) (Rota et al., 1997; 1999a; Peña und Linde-Forsberg, 2000; Ström Holst et al., 2000; Peña et al., 2003b; Hermansson und Linde-Forsberg, 2006; Alhaider und Watson, 2009; Bencharif et al., 2010), einem kommerziell erhältlichen Zusatzstoff zur Anwendung in Spermaverdünnern (Rota et al., 1999a). Weitere Verdünnerzusätze, die SDS enthalten, sind Equex Pasta (Minitüb, Tiefenbach, Germany) (Peña et al., 2003b; Niżański et al., 2009), Orvus ES Paste (Nova Chemical Sales, Scituate, Inc., MA, USA) (Tsutsui et al., 2000; Hori et al., 2006) und Orvus ES Paste (Proctor and Gamble, Cincinnati, OH, USA) (Peña et al., 2003b), wobei der genaue Gehalt an SDS meist unbekannt ist (Peña et al., 2003b; Hori et al., 2006). SDS ist auch als Einzelkomponente auf dem Markt erhältlich (SDS; Schwarz/Mann Biotech, Division of ICN Biomedicals. Inc., Cleveland, OH, USA) (Peña et al., 1998a; Hori et al., 2006).

SDS wird dem Verdünner zugesetzt, um den membranprotektiven Effekt des Eigelbs zu maximieren (Peña et al., 2003b; 2006). Dabei übt es seinen positiven Einfluss durch die Veränderung von Eigelbbestandteilen aus (Pursel et al., 1978; Niżański et al., 2009). Wahrscheinlich werden die aktiven Moleküle des Eigelbs

aufgeschlossen und die Plasmamembran direkt beeinflusst (Niżański et al., 2009). Aus diesem Grund muss SDS immer zusammen mit Eigelb verwendet werden, damit es seine Wirkung ausüben kann (Pursel et al., 1978; Bencharif et al., 2010). Weiterhin ist die protektive Wirkung von SDS größer, wenn die Samenzellen erst unmittelbar vor dem Einfrieren mit dem Detergens in Kontakt gebracht werden, anstatt bereits während der Äquilibrierungsperiode (Peña und Linde-Forsberg, 2000), was darauf hindeutet, dass SDS einen nachteiligen Effekt besitzt, wenn die Kontaktdauer zu lange ist (Bencharif et al., 2010).

Bezüglich der Effekte des Zusatzes von Equex STM Paste bzw. Orvus ES Paste zu Verdünnern für die Kryokonservierung von caninem Sperma lässt sich in der Literatur eine Vielzahl von Untersuchungen finden (Rota et al., 1997; 1999a; Ström Holst et al., 2000; 2001; Tsutsui et al., 2000; Hermansson et al., 2006; Hori et al., 2006; Alhaider und Watson, 2009). Zusammenfassend verbessert der Zusatz von Equex STM Paste zu einem konventionellen TRIS-Gefrierverdünner die Viabilität und die Langlebigkeit der Spermien nach dem Auftauen (Rota et al., 1997), führt zu einer höheren Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit nach dem Auftauen (Rota et al., 1999a; Alhaider und Watson, 2009) und hat eine positive Auswirkung auf die ZP-Bindungsfähigkeit von kryokonservierten Spermien (Ström Holst et al., 2000; 2001).

Über die Auswirkungen des Zusatzes von Equex STM zu Verdünnern für die Flüssigkonservierung ist in der Literatur nur eine Arbeit zu finden (Niżański et al., 2009). In dieser wurde die Verwendung von Equex STM (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) in einem TRIS-Eigelb-Verdünner zur Flüssigkonservierung von caninem Sperma bei 5°C getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Equex STM die Lebensdauer der Spermien bei Inkubation bei 5°C verkürzt. Der zugrunde liegende Mechanismus ist eine initiale Aktivierung gefolgt von einem schnellen Abfall der Motilität (Niżański et al., 2009). CASA-Messungen zeigen deutlich, dass der Zusatz von Equex STM die Spermienmotilitätsparameter in einer ähnlichen Weise verändert, wie sie bei der Hyperaktivierung von Samenzellen gesehen werden kann, welche mit dem Kapazitationsprozess, der im weiblichen Eileiter induziert wird, assoziiert ist. Die Hyperaktivierung wird als kräftige, nicht progressive, nicht lineare Spermienbewegung, verbunden mit der Kapazitation beschrieben. Es ist wahrscheinlich, dass aus der in vitro Hyperaktivierung eine Erschöpfung der Energiereserven, eine Akkumulation von

Metaboliten im Verdünner und schließlich der Zelltod resultiert (Niżański et al., 2009).

2.5.3 Einzelne Verdünner

Es wurden bereits viele verschiedene Verdünner für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma getestet (Concannon und Battista, 1989; Linde-Forsberg, 1991; Peña et al., 2006). Dabei sind die am häufigsten verwendeten Medien milch- oder eigelbbasierte Verdünner mit unterschiedlichen Variationen (Pinto et al., 1999).

Der erste erfolgreich eingesetzte Verdünner war pasteurisierte und für zehn Minuten auf 92-94°C erhitzte Milch (Harrop, 1954; 1956). Heutzutage ist einer der gebräuchlichsten Verdünner ein TRIS-gepufferter Eigelb-Verdünner mit 20 % Eigelb und entweder Glukose- oder Fruktosezusatz (Günzel, 1986; Concannon und Battista, 1989; Linde-Forsberg, 1995; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Hermansson und Linde-Forsberg, 2006; Günzel-Apel, 2007; Pesch et al., 2007). Ein weiterer gängiger Verdünner besteht aus 80 % homogenisierter, pasteurisierter Sahne (12 % Fett) und 20 % Eigelb (Linde-Forsberg, 1991).

Grundsätzlich können kommerzielle und nichtkommerzielle, d. h. selbst im Labor hergestellte, Verdünner unterschieden werden.

Die quantitative Zusammensetzung kommerzieller Verdünner ist oftmals unbekannt, da sie von den Herstellern nicht offengelegt wird (Linde-Forsberg, 1995; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b). Dies, in Kombination mit dem Fehlen von objektiven wissenschaftlichen Studien hinsichtlich der resultierenden Trächtigkeitsraten, macht einen Vergleich mit den gut dokumentierten, nichtkommerziellen Verdünnern schwierig oder gar unmöglich (Linde-Forsberg, 1995). Umgekehrt betrachtet ist die Verfügbarkeit von gebrauchsfertigen Verdünnern allerdings interessant, da sie vergleichende Untersuchungen zwischen verschiedenen Laboren erlauben und konstantere Ergebnisse liefern könnte, als sie mit selbst hergestellten Verdünnern erreicht werden können (Silva und Verstegen, 1995).

Die Herstellung der Verdünner im eigenen Labor ist zeitaufwändig (Pinto et al., 1999) und ggf. fehleranfällig, da es durch die Rezeptangabe in Gramm zu Fehlern beim finalen pH-Wert und/oder der Osmolarität kommen kann (Peña et al., 2006). Durch Angabe der millimolaren Mengen im Rezept können solche Arten von Fehlern vermieden werden (Peña et al., 2006).

Hinsichtlich der Konzeptionsraten, die bei Verwendung der verschiedenen Verdünner erzielt werden können, lassen sich in der Literatur nur wenige Angaben finden. Die nachfolgende Tabelle (Tab. 3) gibt die Trächtigkeitsergebnisse für verschiedene Verdünner wieder (Linde-Forsberg, 1995). Hieraus ist ersichtlich, dass die besten Trächtigkeitsraten mit TRIS-basierten Verdünnern (62,5 % und 57,1 %) und mit dem Sahne-Eigelb-Verdünner (51,1 %) erreicht werden konnten, wenngleich die Anzahl an KBs deutlich variierte (Linde-Forsberg, 1995).

Tab. 3: Trächtigkeitsergebnisse für verschiedene Verdünner zur Flüssigkonservierung von Hundesperma von 1990 bis 1993 (Linde-Forsberg, 1995)

Verdünner	Anzahl an KBs	Trächtigkeiten	
		Anzahl	Prozentsatz
Sahne/Eigelb	137	70	51,1%
unbekannt	44	16	36,4 %
Sahne	26	12	46,2 %
kein Verdünner	17	5	29,4 %
TRIS/Eigelb	16	10	62,5 %
TRIS	7	4	57,1 %
Milch	7	2	28,6 %
Kenney's	5	3	60,0 %
andere Verdünner	10	4	40,0 %
Gesamt	269	126	47,3 %

2.5.3.1 Milchverdünner

Als Verdünner auf Milchbasis für die Flüssigkonservierung von Hundeejakulaten kommen gekochte Magermilch (Thacker und Almquist, 1953; Foote, 1964b; Christiansen, 1984a; Province et al., 1984; Weitze, 2001), homogenisierte, sterilisierte Milch mit 2 % Fett (Christiansen, 1984a), homogenisierte, gekochte Vollmilch (Thacker und Almquist, 1953; Harrop, 1954; Bartlett, 1962a; Foote, 1964b; Weitze, 2001) und sterilisierte Sahne mit 9 % Fett (Foote und Leonard, 1964) in Frage. Ebenso können Kombinationen aus Milch und anderen Komponenten (z. B. Milch-Zitrat und Milch-Eigelb) (Weitze, 2001) oder eine Mischung aus 80 % homogenisierter, pasteurisierter Sahne (12 % Fett) und 20 % Eigelb (Linde-Forsberg, 1991) eingesetzt werden. Das vorherige Aufkochen für zehn Minuten bei 92-94°C (Harrop, 1954; Province et al., 1984) dient der Zerstörung toxischer Substanzen (Weitze, 2001).

Als kommerzieller Verdünner auf Milchbasis ist der NFDMS-G-(Non Fat Dried Milk Solid-Glucose)-Verdünner, welcher bereits 1975 von Kenney beschrieben wurde, zu nennen (Bouchard et al., 1990). Der Kenney-Verdünner (Fa. Hamilton Thorn Research, Beverly, MA, USA), der zur Kurzzeitkonservierung von Hengstsperma routinemäßig verwendet wird, stellt eine Lösung aus Trockenmagermilch, Glukose und Natriumbikarbonat dar (Schäfer et al., 1997) und enthält entweder Ticarcillin oder Gentamicin (Magermilch-Verdünner Kenney-Typ; Lane Manufacturing Inc., Denver, CO) (Pinto et al., 1999).
Die Rezepte einiger Verdünner auf Milchbasis sowie (falls bekannt) deren pH-Werte und Osmolaritäten sind in Tab. A1 (Kap. 9.7.1) wiedergegeben.

Bullenspermien können ihre Motilität in gekochter Magermilch sowie in gekochter, homogenisierter Vollmilch während der Lagerung bei 4°C für zehn Tage erhalten, was sich nicht signifikant von der Lebensdauer in Eigelb-Zitrat-Verdünnern unterscheidet (Thacker und Almquist, 1953). Die Ergebnisse beim Rüden sind dagegen kontrovers. Während Milchverdünner (erhitzte Magermilch bzw. erhitzte, homogenisierte Vollmilch) bei Foote und Leonard (1964) und Foote (1964b) gegenüber den Eigelb-Zitrat-Glycin-Verdünnern mit 20 % Eigelb deutlich unterlegen waren, war bei Bouchard et al. (1990) der milchhaltige Verdünner (NFDMS-G-Verdünner) dem Eigelb-Zitrat-Verdünner mit 3,5 % Eigelb (Fresh Plus Extender, Edwards Agri-Sales Inc., Baraboo, WI) hinsichtlich der Konservierung der Gesamtmotilität und der Vorwärtsbeweglichkeit über den Beobachtungszeitraum von fünf Tagen deutlich überlegen. Allerdings war der Anteil an Spermienagglutinationen im NFDMS-G-Verdünner größer (Bouchard et al., 1990).

2.5.3.2 TRIS-gepufferte Eigelb-Verdünner

Da einer der derzeit gebräuchlichsten Verdünner ein TRIS-Eigelb-Verdünner mit 20 % Eigelb und entweder Glukose- oder Fruktosezusatz ist, werden in Tab. A2 (Kap. 9.7.2) die Rezepte verschiedener TRIS-gepufferter Eigelb-Verdünner dargestellt. Der größte Unterschied zwischen den einzelnen Verdünnern besteht in den eingesetzten Zuckerkomponenten und deren Konzentrationen. Die diversen Effekte von Glukose und Fruktose sowie der Einfluss verschiedener Zuckerkonzentrationen wurden bereits in Kap. 2.5.2.1 beschrieben. Ein weiterer Unterschied ist beim Zusatz von Glycerol zu erkennen: Nur wenige der

dargestellten Verdünner enthalten Glycerol, da Glycerol zur Flüssigkonservierung von Hundesperma normalerweise nicht empfohlen wird (Province et al., 1984).

2.5.3.3 Sonstige Verdünner

In Tab. A3 (Kap. 9.7.3) werden die Rezepte verschiedener sonstiger Verdünner wiedergegeben, welche sich nicht in die Kategorien „Milchverdünner" oder „TRIS-gepufferte Eigelb-Verdünner" einreihen lassen. Hier sind insbesondere die TRIS-Lecithin-Verdünner hervorzuheben, da diese als einzige der genannten Verdünner keine Substanzen tierischer Herkunft enthalten (Beccaglia et al., 2009a; Kmenta et al., 2011).

2.5.3.4 Kommerzielle Verdünner

Es gibt eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Verdünner zur Flüssigkonservierung von caninem Sperma. Allerdings ist deren quantitative Zusammensetzung oftmals unbekannt, da sie von den Herstellern nicht offengelegt wird (Linde-Forsberg, 1995; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b). In Tab. A4 (Kap. 9.7.4) erfolgt die Darstellung verschiedener kommerzieller Verdünner zur Flüssigkonservierung von Hundesperma. Zu einigen der genannten Verdünner (Biladyl, CLONE Chilled Semen Kit, Fresh-phos-Verdünner, Fresh Plus Verdünner, Green-Verdünner, Kenney-Verdünner) gibt es wissenschaftliche Untersuchungen bezüglich ihrer Eignung zur Flüssigkonservierung caniner Spermien (siehe Kap. 2.5.3.5), zu den anderen nicht. Des Weiteren ist anzumerken, dass es sich bei manchen der Verdünner eigentlich um Tiefgefrierverdünner, teilweise auch ursprünglich für andere Spezies entwickelt, handelt, welche von den jeweiligen Autoren jedoch trotzdem zur Flüssigkonservierung von Hundesperma eingesetzt wurden.

2.5.3.5 Vergleichende Untersuchungen

In diesem Kapitel erfolgt eine Darstellung von Studien, in denen verschiedene Verdünner für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma über variierende Untersuchungszeiträume miteinander verglichen wurden.

Bartlett (1962a) verglich einen Eigelb-Phosphat-Verdünner (pH 6,75), einen Eigelb-Zitrat-Verdünner (pH 7,0) und einen Sterilmilch-Verdünner über einen Untersuchungszeitraum von 32 Stunden.
Bei diesem Vergleich konnte beobachtet werden, dass, wenn die Samenzellen im Eigelb-Phosphat-Verdünner bereits vollständig immotil geworden sind,

Samenzellen derselben Spermaprobe im Eigelb-Zitrat- sowie im Sterilmilch-Verdünner noch ihre initiale Motilität aufweisen. Im Eigelb-Zitrat-Verdünner erhielten vier von siebzehn verdünnten Proben ihre initiale Motilität über 24 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur. Die längste Konservierung eines gewissen Maßes an Vorwärtsbeweglichkeit betrug 32 Stunden und konnte mit dem Eigelb-Zitrat-Verdünner erzielt werden. Zusammenfassend wurde die Motilität der Samenzellen bei Raumtemperatur im Eigelb-Zitrat- und im Sterilmilch-Verdünner besser erhalten als im Eigelb-Phosphat-Verdünner (Bartlett, 1962a).

Von Foote und Leonard (1964) wurden verschiedene Verdünner mit variierenden Gehalten an Natriumzitrat, Natriummonohydrogenphosphat, Kaliumdihydrogen-phosphat, Glycin und Eigelb untersucht und außerdem die Auswirkung eines Zusatzes von 8 % Glycerol und diverser Glukosekonzentrationen zu den unterschiedlichen Verdünnern getestet. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich zwischen einem Vollmilch-Verdünner und den Zitrat-Glycin-Verdünnern mit 20 % Eigelbzusatz bzw. zwischen einem Sahne-Verdünner mit 9 % Fett und einem Zitrat-Glycin-Glukose-Verdünner mit ebenfalls 20 % Eigelbzusatz. Der Untersuchungszeitraum betrug 8 bzw. 13 Tage.
Glycerol führte zu einer geringgradig reduzierten Überlebensdauer der Spermien. Der Zitrat-Puffer war dem Phosphat-Puffer und dem Glycin überlegen und 20 % Eigelb dem Zusatz von 50 % Eigelb. Der Zusatz von Glycin zum Zitrat-Puffer erschien nützlich und ein weiterer Zusatz von Glukose zum Verdünner führte zu einer signifikant längeren Erhaltung der Motilität der Spermien. Der Vollmilch-Verdünner lieferte schlechtere Resultate als die Zitrat-Glycin-Verdünner mit 20 % Eigelbzusatz (5 % Gesamtmotilität an Tag 8 versus durchschnittlich 30 %) und auch der Sahne-Verdünner war dem Zitrat-Glycin-Glukose-Verdünner mit 20 % Eigelbzusatz deutlich unterlegen (6 % Gesamtmotilität an Tag 8 versus 56 %). Nach 13-tägiger Lagerung bei 5°C konnten in mit Zitrat-Glycin-Glukose-Verdünner mit 20 % Eigelbzusatz konservierten Ejakulaten noch 40 % motile Samenzellen beobachtet werden (Foote und Leonard, 1964).

Province et al. (1984) untersuchten vergleichend sechs verschiedene Verdünner für die Flüssigkonservierung von Hundesperma bei 5°C solange, bis in zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen im Abstand von 24 Stunden keine Motilität mehr nachweisbar war. Dabei handelte es sich um einen Eigelb-TRIS-, einen

Eigelb-Bikarbonat-, den Beltsville F-3-, den Cornell University-, den Caprogen- und einen Magermilch-Verdünner.
Es konnte gezeigt werden, dass der Beltsville F-3- und der Eigelb-Bikarbonat-Verdünner, welche ursprünglich für die Konservierung von Ebersperma entwickelt wurden, toxisch für Hundespermien waren. Der Caprogen-Verdünner war hingegen zu fast jedem Untersuchungszeitpunkt allen anderen Verdünnern überlegen, obwohl die Gesamtmotilität im Cornell University-Verdünner für die ersten 72 Stunden gleich gut konserviert wurde. Im Caprogen-Verdünner konserviertes Sperma hatte über den Lagerungszeitraum von 240 Stunden eine mittlere Gesamtmotilität von 52 %, verglichen mit 47 % in mit Cornell University-Verdünner konserviertem Sperma. Daher empfehlen Province et al. (1984) den Caprogen-Verdünner für die Flüssigkonservierung von Hundesperma bei 5°C.

Bouchard et al. (1990) verglichen einen NFDMS-G-(Non Fat Dried Milk Solid-Glucose)-Verdünner (Kenney-Verdünner) mit einem Eigelb-Zitrat-Verdünner (Fresh Plus Verdünner) über einen Untersuchungszeitraum von fünf Tagen.
Der NFDMS-G-Verdünner war zur Konservierung der Spermamotilitätsparameter (gemessen als Gesamtmotilität und Vorwärtsbeweglichkeit) dem Eigelb-Zitrat-Verdünner während des gesamten Beobachtungszeitraumes deutlich überlegen. Während im NFDMS-G-Verdünner eine Gesamtmotilität von ca. 50 % über einen Zeitraum von 72 Stunden aufrechterhalten werden konnte, betrug diese Zeitspanne im Eigelb-Zitrat-Verdünner lediglich 12 Stunden. Jedoch konnten im NFDMS-G-Verdünner, insbesondere nach einer Lagerungsdauer von mehr als 72 Stunden, häufiger Agglutinationen beobachtet werden als im Eigelb-Zitrat-Verdünner (Bouchard et al., 1990).

Von Rota et al. (1995) wurden drei verschiedene Verdünner (Eigelb-TRIS-, Eigelb-Milch- und Eigelb-Sahne-Verdünner) für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma bei 4°C über einen Zeitraum von vier Tagen vergleichend untersucht.
Der Eigelb-TRIS-Verdünner war den anderen Verdünnern bezüglich der Erhaltung der Motilität überlegen. An Tag 4 lag die Motilität im Eigelb-TRIS-Verdünner bei 53,6 % verglichen mit 30,4 % im Eigelb-Milch-Verdünner und 14,1 % im Eigelb-Sahne-Verdünner. Zusätzlich wiesen die Samenzellen im Eigelb-TRIS-Verdünner die höchsten Spermiengeschwindigkeiten auf. Hinsichtlich des Akrosomstatus (beurteilt anhand Spermac®-Färbung) und der Plasmamembranintegrität (beurteilt anhand Fluoreszenzfärbung mit CFDA/PI und HOS-Test) waren jedoch keine

Unterschiede zwischen den Verdünnern nachweisbar. Zusammenfassend scheint der Eigelb-TRIS-Verdünner für die Konservierung von caninem Sperma bei 4°C besser geeignet zu sein als die anderen getesteten Verdünner (Rota et al., 1995).

Iguer-Ouada und Verstegen (2001b) verglichen in ihren Untersuchungen die drei kommerziellen Verdünner Green-Verdünner, Fresh-phos-Verdünner und Biladyl-Verdünner jeweils ohne und mit 20 % Eigelbzusatz sowie die vier nichtkommerziellen Verdünner TRIS-Fruktose-Verdünner, TRIS-Glukose-Verdünner, TRIS-BES-Verdünner und EDTA-Verdünner (alle mit 20 % Eigelbzusatz) hinsichtlich ihrer Eignung zur Flüssigkonservierung von Hundesperma bei 4°C. Die Untersuchungen wurden solange durchgeführt, bis keine Motilität mehr nachweisbar war.
Unterschiede zwischen den kommerziellen Verdünnern ohne und mit Eigelbzusatz waren hinsichtlich Gesamtmotilität und anderen Motilitätsparametern (Vorwärtsbeweglichkeit, VAP, VSL, VCL) erst ab Tag 1 feststellbar, wobei die eigelbhaltigen Verdünner überlegen waren. Von letzteren war der Biladyl-Verdünner überlegen; ab Tag 5 war die Gesamtmotilität signifikant höher und nach 8,3 ± 0,2 Tagen waren 50 % der Spermien durch gute Motilitätsparameter charakterisiert; insgesamt konnte die Motilität für 10 Tage erhalten werden.
Während der TRIS-BES- und der EDTA-Verdünner einen unmittelbaren depressiven Effekt auf die verschiedenen Motilitätsparameter hatten, waren der TRIS-Fruktose- und der TRIS-Glukose-Verdünner gut geeignet, die Motilitätsparameter zu konservieren. Der TRIS-Glukose-Verdünner war ab Tag 4 (Vorwärtsbeweglichkeit) bzw. Tag 8 (Gesamtmotilität) dem TRIS-Fruktose-Verdünner signifikant überlegen. Dieser Unterschied ist vermutlich auf das Energiesubstrat (Glukose anstelle von Fruktose) zurückzuführen, wobei Glukose einen positiveren Effekt auf die Erhaltung der Motilität ausübt als Fruktose. Im TRIS-Fruktose-Verdünner zeigten nach einer Lagerungsdauer von 9,7 ± 0,6 Tagen noch 50 % der Spermien gute Motilitätsparameter, während dies im TRIS-Glukose-Verdünner nach 13,1 ± 1,1 Tagen der Fall war. Insgesamt konnte die Motilität im TRIS-Glukose-Verdünner für 16 Tage erhalten werden.
Zusammenfassend war unter den kommerziellen Verdünnern der Biladyl-Verdünner der beste der getesteten Verdünner und unter den im Labor hergestellten Verdünnern der TRIS-Glukose-Verdünner. Durch die Verlängerung der Konservierung der Spermaqualität auf etwa 13 Tage im Vergleich zu circa 8,5

Tagen im Biladyl-Verdünner erscheint der TRIS-Glukose-Verdünner jedoch überlegen. Die Autoren postulierten außerdem einen protektiven Effekt von Eigelb auf die AR; das Eigelb schien die Samenzellen gegen spontane AR zu schützen (Prozentsatz an akrosomreagierten Spermien beurteilt anhand des Chlortetracyclin-Assays). Wenngleich dieser Effekt bei den kommerziellen sowie bei den im Labor hergestellten Verdünnern zu beobachten war, erwies sich bezüglich der akrosomalen Integrität jedoch erneut der TRIS-Glukose-Verdünner als am geeignetsten (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b).

Tsutsui et al. (2003b) beurteilten einen Eigelb-Zitrat-Glycin-Glukose-, einen Eigelb-TRIS-Fruktose-Zitrat- und einen Eigelb-Natriumzitratdihydrat-Verdünner über einen Untersuchungszeitraum von zwölf Tagen.
Beim Vergleich der drei Verdünner konnte festgestellt werden, dass der Eigelb-Natriumzitratdihydrat-Verdünner für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma aufgrund mangelhafter Motilitätskonservierung nicht geeignet ist. Im Eigelb-Zitrat-Glycin-Glukose- sowie im Eigelb-TRIS-Fruktose-Zitrat-Verdünner betrug die Motilität dagegen noch mindestens 60 % nach einer Lagerungsdauer von sechs Tagen und mindestens 20 % nach zwölf Tagen. An Tag 12 war der Eigelb-TRIS-Fruktose-Zitrat-Verdünner hinsichtlich Motilität, Viabilität (beurteilt anhand Eosin-Nigrosin-Färbung) und Akrosomintegrität (beurteilt mit der Triple-Färbetechnik) überlegen. Der Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen war jedoch im Eigelb-TRIS-Fruktose-Zitrat-Verdünner geringfügig höher als in den anderen Verdünnern.
Besamungsversuche mit einer Besamungsdosis von 4×10^8 Samenzellen haben gezeigt, dass mit Eigelb-TRIS-Fruktose-Zitrat-Verdünner konserviertes canines Sperma vier Tage lang für intravaginale Besamungen genutzt werden kann (Konzeptionsrate nach viertägiger Lagerung 83,3 %, mittlere Wurfgröße $3,2 \pm 1,3$) (Tsutsui et al., 2003b).

Hermansson und Linde-Forsberg (2006) untersuchten mit Uppsala Equex-2-Verdünner (UE-2/1 und UE-2/2) und mit TRIS-Eigelb-Fruktose-Verdünner (EYT/1 und EYT/2) konserviertes canines Sperma über einen Zeitraum von zwei Tagen. Das Ziel dieser Studie bestand darin, herauszufinden, ob flüssigkonserviertes Sperma nach ein bis zwei Tagen Lagerungsdauer bei 4°C noch erfolgreich kryokonserviert werden kann. Aufgrund der verwendeten Verdünner erscheint eine Darstellung der Ergebnisse vor dem Einfrieren jedoch trotzdem interessant, da die

Verdünner denen der eigenen Untersuchungen entsprechen. Dabei besteht der einzige Unterschied zwischen den beiden Verdünnern im Glycerolgehalt; der Uppsala Equex-2-Verdünner enthält Glycerol (UE-2/1 mit 3 % Glycerol, UE-2/2 mit 7 % Glycerol), der TRIS-Eigelb-Fruktose-Verdünner nicht bzw. erst im zweiten „Teilverdünner“ (EYT/1 mit 0 % Glycerol, EYT/2 mit 10 % Glycerol).
Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass flüssigkonservierte Hundespermien nach einer Lagerungsdauer von ein oder zwei Tagen kryokonserviert werden können, ohne dass es zu einer signifikanten Verschlechterung der Motilität (subjektive Schätzung unter dem Phasenkontrastmikroskop nach der Gewinnung und vor dem Einfrieren; Messung mit CASA nach dem Auftauen), der akrosomalen Integrität (FITC-PNA (Fluoresceinisothiocyanat Peanut Agglutinin)/PI-Färbung) oder der Plasmamembranintegrität (CFDA/PI-Färbung; nur nach dem Auftauen) nach dem Auftauen kommt, verglichen mit der Kryokonservierung unmittelbar nach der Samengewinnung, wobei der Uppsala Equex-2-Verdünner dem TRIS-Eigelb-Fruktose-Verdünner überlegen ist.
Betrachtet man die Motilität der Proben vor dem Einfrieren im Uppsala Equex-2-Verdünner (nur UE-2/1), so verschlechtert sich diese von 81,7 ± 2,9 % unmittelbar nach der Verdünnung auf 60,0 ± 10,0 % nach 24 Stunden Lagerung und auf 30,0 ± 17,3 % nach 48 Stunden. Im TRIS-Eigelb-Fruktose-Verdünner (nur EYT/1) liegt die Motilität nach 24 Stunden bei 60,0 ± 0 % und nach 48 Stunden bei 40,0 ± 17,3 %. Der Anteil an intakten Akrosomen beträgt im Uppsala Equex-2-Verdünner (nur UE-2/1) unmittelbar nach dem Verdünnen 96,5 ± 1,6 % und sinkt nach 24 Stunden auf 91,2 ± 2,5 % im Uppsala Equex-2-Verdünner (nur UE-2/1) bzw. auf 84,7 ± 4,1 % im TRIS-Eigelb-Fruktose-Verdünner (nur EYT/1) und nach 48 Stunden auf 86,5 ± 0,58 % im Uppsala Equex-2-Verdünner (nur UE-2/1) bzw. auf 89,2 ± 5,5 % im TRIS-Eigelb-Fruktose-Verdünner (nur EYT/1) (Hermansson und Linde-Forsberg, 2006). Für die Flüssigkonservierung über zwei Tage scheint nach diesen Ergebnissen also der TRIS-Eigelb-Fruktose-Verdünner (nur EYT/1) etwas besser geeignet zu sein als der Uppsala Equex-2-Verdünner (nur UE-2/1).

In einer weiteren Studie untersuchten Hermansson et al., 2006 die Auswirkungen der Lagerung von mit Uppsala Equex-2-Verdünner (nur UE-2/1) konserviertem Sperma auf die ZP-Bindungsfähigkeit nach ein und zwei Tagen Lagerungsdauer bei 4°C. Die Ergebnisse für die Parameter Motilität (subjektive Schätzung und Messung mit CASA), akrosomale Integrität (FITC-PNA/PI-Färbung) und

Plasmamembranintegrität (CFDA/PI-Färbung) sind in der folgenden Tabelle (Tab. 4) dargestellt.

Tab. 4: Motilität, akrosomale Integrität und Plasmamembranintegrität im Nativsperma und in mit UE-2/1 („Teilverdünner 1" des Uppsala Equex-2-Verdünners) für ein oder zwei Tage bei 4°C flüssigkonserviertem Sperma (Hermansson et al., 2006)

Spermabehandlung	Motilität (%)	intakte Akrosome (%)	intakte Plasmamembranen (%)
Nativsperma	91,5 ± 2,6	93,7 ± 3,8	84,2 ± 3,0
1 Tag flüssigkonserviert	84,8 ± 8,7	94,0 ± 2,0	72,6 ± 11,2
2 Tage flüssigkonserviert	78,5 ± 5,8	92,8 ± 1,0	72,2 ± 11,2

Hieraus ist ersichtlich, dass bei Flüssigkonservierung mit dem Uppsala Equex-2-Verdünner (nur UE-2/1) über zwei Tage zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden können.

Shahiduzzaman und Linde-Forsberg (2007) verglichen den kommerziellen CLONE Chilled Semen-Verdünner mit einem nichtkommerziellen TRIS-Eigelb-Glukose-Verdünner über einen Untersuchungszeitraum von 23 Tagen.
Die genaue Zusammensetzung des CLONE Chilled Semen-Verdünners ist unbekannt. Prinzip im CLONE Chilled Semen-Verdünner ist, dass die Samenzellen immotil werden und dies über die Dauer der Lagerung bei 5°C bleiben. Erst nach Zusatz des Aktivators aus dem CLONE Chilled Semen Kit und Wiedererwärmung bei 37°C für 8-10 Minuten kommt es dann zu einer Reaktivierung der Motilität, wobei deren genaue Mechanismen unbekannt sind. Allerdings erlangen in CLONE Chilled Semen-Verdünner konservierte Samenzellen, wenn auch langsamer, ihre Motilität auch ohne den Zusatz des Aktivators zurück, wenn sie Raumtemperatur oder 37°C ausgesetzt werden. Im Gegensatz dazu behalten mit TRIS-Eigelb-Glukose-Verdünner konservierte Spermien ihre Motilität während der Lagerung bei 5°C bei.
Alle untersuchten Parameter (Gesamtmotilität, Integrität der Plasmamembran und des Akrosoms) wurden im Zeitverlauf im TRIS-Eigelb-Glukose-Verdünner besser konserviert als im CLONE Chilled Semen-Verdünner, was die Hypothese widerlegt, dass die durch den CLONE Chilled Semen-Verdünner induzierte Immotilität einen positiven Einfluss auf die Langlebigkeit der Spermien hat. Bei Lagerung bei 5°C im TRIS-Eigelb-Glukose-Verdünner scheint Hundesperma guter

Qualität für bis zu 14 Tage konserviert werden zu können (Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007).

Beccaglia et al. (2009a) untersuchten vergleichend einen TRIS-Eigelb- und einen TRIS-Lecithin-Verdünner für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma über einen Zeitraum von vier Tagen.
Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass Lecithin als eine geeignete Alternative zu Eigelb bei der Flüssigkonservierung von caninem Sperma angesehen werden kann. Der TRIS-Eigelb- und der TRIS-Lecithin-Verdünner lieferten ähnliche Werte hinsichtlich der gemessenen Motilitätsraten, der Anzahl an nicht kapazitierten Spermien und der Anzahl an Samenzellen, die an die ZP der Eizelle binden, sodass der TRIS-Lecithin-Verdünner für die Konservierung des Spermas über vier Tage eingesetzt werden kann (Beccaglia et al., 2009a).

Kmenta et al. (2011) verglichen einen TRIS-Eigelb-, einen TRIS-Lecithin-, einen TRIS-Lecithin-Katalase- und einen TRIS-Lecithin-Katalase-Tyrosin-Verdünner über einen Untersuchungszeitraum von acht Tagen.
Neben dem Vergleich der vier genannten Verdünner wurden in dieser Studie die Auswirkungen verschiedener „Enhancer“-Zusätze, welche dem flüssig-konservierten Sperma nach der Wiedererwärmung (unmittelbar vor der Beurteilung) im Verhältnis 1 : 1 zugegeben wurden, untersucht. Bei den „Enhancern“ handelte es sich um TRIS-Puffer, TRIS-Puffer mit 0,02 mg Acetylcarnitin/ml, TRIS-Puffer mit 0,1 mg Acetylcarnitin/ml und TRIS-Puffer mit 0,2 mg Acetylcarnitin/ml. Die Verwendung eines „Enhancers“ erwies sich bei allen getesteten Verdünnern als nützlich; durch dessen Zusatz konnte in allen Verdünnern die mittels CASA bestimmte Vorwärtsbeweglichkeit nach der Wiedererwärmung verbessert werden.
Im TRIS-Eigelb-Verdünner wurde die höchste Vorwärtsbeweglichkeit an Tag 8 mit dem TRIS-Puffer als „Enhancer“ erzielt, während sich bezüglich der Vorwärtsbeweglichkeit im TRIS-Lecithin-, im TRIS-Lecithin-Katalase- und im TRIS-Lecithin-Katalase-Tyrosin-Verdünner keine Unterschiede zwischen den verschiedenen „Enhancern“ zeigten. Die Viabilität an Tag 8 konnte im TRIS-Lecithin- und im TRIS-Lecithin-Katalase-Tyrosin-Verdünner durch den Zusatz von TRIS-Puffer mit 0,2 mg Acetylcarnitin/ml als „Enhancer“ gesteigert werden. Insgesamt wurden durch die Zugabe von TRIS-Puffer unmittelbar vor der Untersuchung des flüssigkonservierten Spermas sowohl die Motilität als auch die

Viabilität in allen Proben signifikant verbessert. Der Zusatz von Acetylcarnitin zum „Enhancer“ brachte keine weitere Verbesserung der Spermaqualität.
Nach 3-tägiger Flüssigkonservierung bei 4°C war die mittels CASA bestimmte Vorwärtsbeweglichkeit im TRIS-Lecithin-Katalase-Verdünner (mit TRIS-Puffer als „Enhancer“) signifikant höher als in den anderen getesteten Verdünnern und auch nach 8-tägiger Lagerung konnten im TRIS-Lecithin-Katalase- und im TRIS-Lecithin-Katalase-Tyrosin-Verdünner noch eine Vorwärtsbeweglichkeit > 70 % (jeweils mit TRIS-Puffer als „Enhancer“) und eine Viabilität > 80 % beobachtet werden, wohingegen die Werte im TRIS-Eigelb- und im TRIS-Lecithin-Verdünner an Tag 8 bereits signifikant geringer waren. Der Prozentsatz an morphologisch veränderten Samenzellen war sowohl an Tag 0 als auch an Tag 8 im TRIS-Eigelb-Verdünner am höchsten. Der TRIS-Lecithin-Katalase-Verdünner war zudem aufgrund der signifikant höheren ZP-Bindungsfähigkeit der Samenzellen an den Tagen 0 und 3, insbesondere gegenüber dem TRIS-Eigelb-Verdünner, überlegen.
Insgesamt konservierte der TRIS-Lecithin-Katalase-Verdünner die Vorwärtsbeweglichkeit und die Viabilität während der Flüssigkonservierung bei 4°C über acht Tage besser als der TRIS-Eigelb-Verdünner; allerdings nur, wenn ein „Enhancer“ verwendet wurde. Daher kamen die Autoren zu dem Schluss, dass der TRIS-Lecithin-Katalase-Verdünner mit 0,8 % Lecithin und 150 U/ml Katalase besser zur Flüssigkonservierung von caninem Sperma geeignet ist als der konventionelle TRIS-Eigelb-Verdünner (Kmenta et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich bei Betrachtung aller genannten Studien feststellen, dass die besten Konservierungsergebnisse für canines Flüssigsperma mit Zitrat- und/oder TRIS-gepufferten, eigelbhaltigen Verdünnern erzielt werden können (Foote und Leonard, 1964; Province et al., 1984; Rota et al., 1995; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Tsutsui et al., 2003b; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007). Die akzeptablen Motilitätsergebnisse schwanken je nach Autor zwischen einer Dauer von vier und bis zu mehr als zehn Tagen. Glukose scheint als Energiesubstrat besser geeignet zu sein als Fruktose, da mit Glukose über etwa 13 (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b) bzw. 14 Tage (Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007) akzeptable Motilitätswerte erzielt wurden, im Vergleich zu etwa zehn Tagen mit Fruktose (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b). Inwieweit dies auf eine Präferenz von Hundespermien für die Metabolisierung von Glukose anstelle von Fruktose hindeutet (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b), bleibt

unbeantwortet. Lecithin scheint eine geeignete Alternative zu Eigelb zu sein, da die Konservierungsergebnisse vergleichbar (Beccaglia et al., 2009a) oder sogar überlegen sind (Kmenta et al., 2011).

3 Material und Methoden

3.1 Probanden

Das für die Untersuchungen genutzte Sperma wurde im Zeitraum von April bis Juni 2010 in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen (KGGA) von 30 gesunden und zuchttauglichen Rüden 16 verschiedener Rassen im Alter von ein bis neun Jahren (3,4 ± 2,2 Jahre) gewonnen. Die Rasseverteilung innerhalb des Probandenkollektivs sowie weitere Angaben zu den einzelnen Hunden sind in Tab. 5 wiedergegeben.

Tab. 5: Angaben zu den einzelnen Hunden (n = 30)

Nr.	Rasse	Alter (in Jahren)	bisherige Zuchtnutzung
1	Neufundländer	3	Ja
2	Neufundländer	8	Ja
3	Rhodesian Ridgeback	3	Ja
4	Beagle	1,5	Nein
5	Beagle	2	Nein
6	Gordon Setter	2,5	Ja
7	Rottweiler	7	Ja
8	Rottweiler	1,5	Nein
9	Presa Canario	3	Ja
10	Labrador Retriever	1,5	Nein
11	Labrador Retriever	1,5	Nein
12	Rhodesian Ridgeback	6	Ja
13	Border Collie-Mischling	1,5	Nein
14	Deutscher Schäferhund	4	Ja
15	Riesenschnauzer	1,5	Nein
16	Bullmastiff	3	Ja
17	Rottweiler	2	Nein
18	Bernhardiner	3	Ja
19	Bernhardiner	1	Nein
20	Bullmastiff	3	Nein
21	Bearded Collie	2	Ja
22	Labrador Retriever	6,5	Nein
23	Rhodesian Ridgeback	7	Ja
24	Rhodesian Ridgeback	9	Ja
25	Golden Retriever	4	Ja
26	Golden Retriever	2	Nein
27	Deutscher Schäferhund	2	Nein
28	Belgischer Schäferhund	2	Nein
29	Deerhound	4	Ja
30	Neufundländer	3	Ja

Die Hunde stammten mit Ausnahme der zwei Beagle-Rüden, die Eigentum der Klinik für Kleintiere (Innere Medizin) der Justus-Liebig-Universität Gießen sind, aus privaten Haltungen. Der aufgenommene Vorbericht beschränkte sich auf das Alter der Tiere, die bisherige Zuchtnutzung und den Gesundheitsstatus.
Zum Zeitpunkt der Untersuchungen zeigten alle Probanden ein ungestörtes Allgemeinbefinden und auch die Vitalparameter lagen bei den einzelnen Rüden stets im Normbereich. Der Ernährungs- ebenso wie der Pflegezustand war bei allen Tieren als gut zu beurteilen. Mit Ausnahme eine Hundes (Nr. 24; Hodentumor rechts) wiesen die Probanden keine adspektorisch oder palpatorisch nachweisbaren Erkrankungen der äußeren Geschlechtsorgane auf.

3.2 Spermagewinnung

Von jedem der 30 Rüden wurde jeweils ein Ejakulat gewonnen. Die Samengewinnung fand immer in gleicher Weise in einem separaten Raum in Anwesenheit einer läufigen bzw. einer mit synthetischem Pheromon (Methyl-4-hydroxybenzoat in alkoholischer Lösung, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze) präparierten Beagle-Hündin zur sexuellen Stimulation statt (Ausnahmen: Hund Nr. 3: keine Hündin; Hund Nr. 22: läufige Rhodesian Ridgeback-Hündin). Sie erfolgte mit behandschuhten Händen durch manuelle Stimulation des Penis. Die Hunde wurden dabei aufgrund ihrer Größe auf dem Boden belassen. Zunächst wurde der Bulbusschwellkörper durch das Präputium hindurch kräftig massiert, bis es zu einer partiellen Erektion kam, die am beginnenden „Aufknoten" des Bulbus glandis zu erkennen war. Nun wurde der Penis zügig aus der Präputialhöhle vorgelagert und mit Zeigefinger und Daumen der linken Hand hinter dem Bulbusschwellkörper ein Ring gebildet, wobei der Handrücken zur Bauchwand des Hundes zeigte. In der rechten Hand wurde das Tulpenglas zum Auffangen des Sekrets gehalten und mit der linken Hand erfolgte eine rhythmische Massage des Penis. Den Umsteigeversuchen des Rüden wurde entgegengekommen, indem der Penis um 180° nach kaudoventral gedreht wurde, um so das Hängen zu imitieren. Nach der Abgabe einer ausreichenden Menge an Prostatasekret wurde die Stimulation durch Lösen der Fixation des Penis beendet und die Rüden wurden noch solange beobachtet, bis der Penis wieder vollständig eingeschachtet war (Hoffmann, 2003a; Kutzler, 2005).

Die Ejakulate wurden fraktioniert in sterilen, auf 37°C angewärmten, graduierten Tulpengläsern (Minitüb GmbH, Tiefenbach) aufgefangen und bis zur Untersuchung im Wasserbad bei 37°C aufbewahrt. Die Trennung der verschiedenen Ejakulatfraktionen erfolgte durch Gläserwechsel bei makroskopisch sichtbarer Farb- und Konsistenzänderung des Sekrets in Vorsekret (Fraktion 1; klar), spermienreiche Fraktion (Fraktion 2; trüb, milchig) und Nachsekret (Fraktion 3/spermienarme Fraktion/Prostatasekret; klar, wässrig) (Linde-Forsberg, 1991; Kutzler, 2005).
Im Anschluss an die Samengewinnung wurde das Ejakulat unverzüglich ins Labor gebracht, wo eine Beurteilung des gewonnenen Spermas sowie dessen Weiterverarbeitung erfolgte.

3.3 Spermabeurteilung

Das gewonnene Sperma wurde sowohl nach den Methoden der klassischen Spermatologie als auch mittels CASA (SpermVision™-System) untersucht. Eine graphische Übersicht der Vorgehensweise ist in Abb. 3 dargestellt.
Alle verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Rezepte sowie die Herstellerangaben sind dem Anhang (Kap. 9) zu entnehmen.

Spermagewinnung

↓

Spermabeurteilung

1. Makroskopische Untersuchung
2. Chemisch-physikalische Untersuchung
3. Mikroskopische Untersuchung
4. Spermac®-Färbung
5. Hypoosmotischer Schwelltest
6. Untersuchung mittels CASA (SpermVision™)

Abb. 3: Vorgehensweise bei der Spermabeurteilung

3.3.1 Klassische Spermatologie

3.3.1.1 Makroskopische Untersuchung

Die makroskopische Untersuchung stand am Anfang der Spermabeurteilung. Von jedem gewonnenen Ejakulat wurden dabei für alle drei Fraktionen Volumen, Farbe, Geruch, Konsistenz und etwaige Beimengungen (z. B. Blut oder Eiter) erfasst (Hoffmann, 2003b). Das Volumen wurde durch Ablesen der Graduierung an den Samenauffanggläsern festgestellt und in Millilitern (ml) angegeben.

3.3.1.2 Chemisch-physikalische Untersuchung

Bei allen drei Fraktionen wurde eine pH-Wert-Messung mittels Indikatorpapier (pH 5,4-7,0 Spezialindikator; Merck KGaA, Darmstadt) durchgeführt (Freshman, 2002), indem ein 10 µl großer Tropfen der entsprechenden Fraktion mittels Eppendorf-Pipette (Eppendorf AG, Hamburg) auf das Indikatorpapier gegeben und das Ergebnis (Farbänderung des Indikatorpapiers) mithilfe einer Referenzfarbskala abgelesen wurde.

3.3.1.3 Mikroskopische Untersuchung

Die mikroskopische Untersuchung beinhaltete die Schätzung der Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen, die Ermittlung des Verhältnisses lebender zu toter Samenzellen und des qualitativen und quantitativen Vorkommens morphologisch veränderter Samenzellen mittels Eosinausstrich, die Bestimmung der Dichte mit der Neubauer-Zählkammer sowie den Nachweis von Agglutinationen oder etwaiger sonstiger mikroskopischer Beimengungen (z. B. Fremdzellen) im Ejakulat (Hoffmann, 2003b). Sie wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop (Objektive: 10x/0,25; 20x/0,35; 40x/0,65; 100x/1,25 (Oel)) mit auf 37°C beheizbarem Objektträgertisch (hund H 500; Helmut Hund GmbH, Wetzlar) durchgeführt. Die Auswertung der Eosinausstriche erfolgte zum Teil an einem Phasenkontrastmikroskop (Objektive: E_2 PLAN 4x/0,10; E_2 PLAN PH 10x/0,25; E_2 PLAN PH 40x/0,65) ohne beheizbaren Objektträgertisch (Leica CM E; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar). Zum Auszählen der verschiedenen Parameter wurde ein elektronisches Zählgerät („Assistent“ Counter 345/15, Typ AC-15 PC; Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim) verwendet.

a) Vorwärtsbeweglichkeit

Die Schätzung der Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen erfolgte am Deckglaspräparat bei 400-facher Vergrößerung mit positivem Phasenkontrast. Zur Herstellung des Deckglaspräparates wurde nach mehrmaligem Schwenken des Tulpenglases mithilfe einer Eppendorf-Pipette (Eppendorf AG, Hamburg) ein 10 µl großer Tropfen Sperma auf einen vorgewärmten Objektträger (37°C) gegeben und dieser dann mit einem Deckglas (18 x 18 mm) abgedeckt. Ein Spermium galt als vorwärtsbeweglich, wenn es mindestens zwei Drittel des Gesichtsfeldes mehr oder weniger linear durchquerte (Hoffmann, 2003b). Es wurden mehrere Gesichtsfelder im Zentrum des Spermatropfens beurteilt und anschließend der prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen an der Gesamtheit der Samenzellen geschätzt.

Für alle weiteren Untersuchungen fand nur die zweite, spermienreiche Fraktion Verwendung, während die erste sowie die dritte Fraktion verworfen wurden. Ausnahmen bildeten die Hunde Nr. 5 und Nr. 10, bei denen aufgrund ungenauer Fraktionierung und zwecks Volumenvergrößerung die erste und die zweite Fraktion gepoolt und dann zusammen weiterverarbeitet wurden.

b) Lebend-Tot-Färbung

Die Lebend-Tot-Färbung (Supravitalfärbung) zur Ermittlung des Verhältnisses lebender zu toter Samenzellen erfolgte mittels Eosinausstrich. Dazu wurde mithilfe einer Eppendorf-Pipette (Eppendorf AG, Hamburg) ein 10 µl großer Tropfen Sperma auf einen auf 37°C vorgewärmten Objektträger gegeben, dann ein doppelt so großer Tropfen der Eosin-Färbelösung (Rezept siehe Kap. 9.5.3.1) daneben gegeben, durch mehrmaliges, vorsichtiges Hin-und-her-Schwenken für 20 Sekunden miteinander vermischt und dann auf einem weiteren, ebenfalls angewärmten Objektträger in einem Zug ausgestrichen. Der Ausstrich wurde anschließend luftgetrocknet. Bei toten Spermien ist die Plasmamembran permeabel für den Farbstoff Eosin. Im Eosinausstrich rotgefärbte Spermien waren demnach zum Zeitpunkt der Färbung tot (Hoffmann, 2003b). Insgesamt wurden pro Ejakulat je 200 Spermien bei 400-facher Vergrößerung mit negativem Phasenkontrast ausgezählt. Die ungefärbten Samenzellen (weiße Köpfe) wurden als lebend, die gefärbten (rote Köpfe) als tot bewertet.

c) Pathomorphologie

Die Beurteilung der morphologisch veränderten Samenzellen erfolgte an demselben Eosinausstrich. Hierzu wurden ebenfalls 200 Spermien bei 400-facher Vergrößerung und negativem Phasenkontrast ausgezählt. Es spielte dabei keine Rolle, ob die ausgezählten Spermien lebend oder tot waren. Die morphologischen Veränderungen wurden aufgegliedert in primäre Veränderungen (Kopfkappen-, Kopf-, Hals- und Schwanzveränderungen), sekundäre/tertiäre Veränderungen und Plasmatropfen (Tab. 6) und als prozentualer Anteil an der Gesamtspermienpopulation angegeben. Waren an einer Samenzelle mehrere morphologische Abweichungen zu erkennen, so wurde nur die Schwerwiegendste unter ihnen beachtet.

Tab. 6: Einteilung der morphologischen Veränderungen nach Hoffmann (2003c), modifiziert

I. d. R. primäre Veränderungen
1. Kopfkappenveränderungen - abgelöst - schief - sonstiges 2. Kopfveränderungen - schmal - lanzenförmig - Zwergköpfe - Riesenköpfe - sonstiges (z. B. Doppelkopf) 3. Halsveränderungen - abaxialer Schwanzansatz - paraaxialer Schwanzansatz - retroaxialer Schwanzansatz - sonstiges (Halsbruch) 4. Schwanzveränderungen - schleifenförmig - aufgerollt - um den Kopf gerollt - abgeknickt - sonstiges (z. B. Doppelschwanz, Auffransung des Mittelstückes)
I. d. R. sekundäre/tertiäre Veränderungen 1. lose Köpfe 2. Krümmlinge 3. sonstiges
Plasmatropfen im Bereich von - Hals - Mittelstück - Endstück

d) Dichtebestimmung

Die Dichtebestimmung erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer; Tiefe 0,100 mm, Fläche 0,0025 mm²; Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg). Bei der Vorbereitung der Zählkammer wurde darauf geachtet, dass das Deckglas (Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig) so fest an die Zählkammer angedrückt wurde, bis es an den Haftstellen auf den Seitenstegen der Zählkammer zur Bildung von Newton'schen Ringen kam. Das Sperma wurde nach behutsamem Mischen in einer Erythrozytenmischpipette nach Thoma bis zur Marke 1 (zweite Markierungslinie) aufgezogen, danach die Pipette von außen mit einem Wattetupfer abgewischt und anschließend Leitungswasser bis zur Marke 101 (dritte Markierungslinie) nachgezogen, wodurch eine 100-fache Verdünnung entstand. Nach Schwenken der Pipette zur Durchmischung und Verwerfen der ersten Tropfen wurde mit der Pipette je ein Tropfen des Sperma/Wasser-Gemisches an den beiden Rändern des Deckglases aufgebracht, von wo aus das Gemisch dann durch Kapillarkräfte eingesogen wurde. Es wurden bei 400-facher Vergrößerung mit positivem Phasenkontrast fünf Erythrozytenzählfelder mit jeweils 16 Kleinstquadraten ausgezählt. Dabei wurden nur Spermien gezählt, deren Köpfe innerhalb der Kleinstquadrate oder auf deren linken oder unteren Begrenzungslinie lagen. Zur Berechnung der Dichte fand die Formel nach Neubauer Anwendung (siehe Formel 1). Aus der so bestimmten Dichte wurde in Verbindung mit dem bereits zuvor bestimmten Ejakulatvolumen die SGZ berechnet (siehe Formel 2) (Christiansen, 1984b; Hoffmann, 2003b).

Formel 1: Dichteberechnung

N = (Z x 4000 x V) / 80

N = Dichte; durchschnittliche Spermienzahl pro µl Sperma

Z = Gesamtzahl der ausgezählten Spermien in 80 Kleinstquadraten

1/4000 µl = Referenzvolumen (Tiefe 0,1 mm x Fläche 0,0025 mm^2)

V = Verdünnungsfaktor

Formel 2: Berechnung der SGZ im Ejakulat

SGZ = N x Ejakulatvolumen in µl

3.3.2 Spermac®-Färbung

Zur Beurteilung der akrosomalen Integrität (Kopfkappe) wurde eine Spermac®-Färbung (FertilPro N. V., Beernem, Belgien) angefertigt. Bei dieser Färbung handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Färbeset zur selektiven Anfärbung der Bestandteile einer Samenzelle einschließlich des Akrosoms. Die Färbemethode stammt aus der Humanmedizin und besteht aus einer Fixierlösung und drei Farblösungen, deren genaue Zusammensetzung jedoch unbekannt ist. Zunächst wurde ein 10 µl großer Tropfen Sperma auf einen angewärmten Objektträger (37°C) gegeben und mit einem weiteren Objektträger ausgestrichen. Dieser Ausstrich wurde ca. fünf Minuten luftgetrocknet und dann in der Fixierlösung (Fixans) für fünf bis zehn Minuten fixiert. Danach erfolgte ein Waschen des Objektträgers durch mehrfaches Eintauchen und Schwenken in einem Becherglas mit Leitungswasser bevor für zwei Minuten mit Färbelösung A (Reagenz A, rot) gefärbt wurde. Anschließend wurde der Objektträger zweimal wie oben beschrieben gewaschen und in Färbelösung B (Reagenz B, blassgrün) überführt, in der er für eine Minute verblieb. Nach nochmaligem Waschen wurde er dann für eine Minute in Färbelösung C (Reagenz C, dunkelgrün) gegeben und im Anschluss ein letztes Mal gewaschen. Das Wasser zum Waschen der Objektträger wurde nach jedem Waschvorgang ausgetauscht und nach jedem Waschen wurde der Objektträger mit der schmalen unteren Seite auf saugfähiges Zellstoffpapier gedrückt, um restliches Wasser zu entfernen. Nach dem letzten Waschen wurde der gefärbte Ausstrich luftgetrocknet und im Anschluss wurden 200 Spermien bei 1000-facher Vergrößerung mit Ölimmersion und negativem Phasenkontrast beurteilt. Die verschiedenen Spermienanteile stellten sich wie folgt dar: Akrosom (Kopfkappe) - grün, Kern - rot, äquatoriales Band - blassgrün, Mittelstück und Schwanz - grün. Bei Normospermie sollte der Anteil an akrosomgeschädigten Spermien im Gesamtejakulat 5 % nicht übersteigen und der Anteil pathologisch veränderter Samenzellen sollte maximal 20 % betragen (Riesenbeck et al., 2001). Es wurden nur die Kopfkappenveränderungen beachtet und diese in abgelöste Kopfkappen, schiefe Kopfkappen und sonstige Veränderungen (z. B. geschwollene Kopfkappen) differenziert.

3.3.3 HOS-Test

Zur Beurteilung des Funktionszustandes der Plasmamembran wurde der HOS-Test eingesetzt. Hierbei zeigen intakte Spermien unter hypoosmotischen

Bedingungen infolge von Wasseraufnahme eine Anschwellung, die sich in einem charakteristischen Aufrollen des Schwanzes äußert („curled tail“), während membrandefekte Spermien dieses Phänomen nicht erkennen lassen („not curled“) (Riesenbeck et al., 2001). Die hypoosmotische Lösung wurde im Vorherein nach Rezept (siehe Kap. 9.5.3.2) hergestellt und in Portionen von 100 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg) im Gefrierfach bei - 21°C gelagert. Vor Gebrauch wurde sie aufgetaut und auf 37°C angewärmt. Für die Untersuchung wurden in die 100 µl hypoosmotische Lösung mithilfe einer Eppendorf-Pipette (Eppendorf AG, Hamburg) 10 µl Sperma eingebracht. Das Gemisch wurde kurz geschwenkt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Riesenbeck et al., 2001). Im Anschluss wurde aus 10 µl dieses Gemisches ein Deckglaspräparat hergestellt, welches nach fünfminütiger Absenkungszeit ausgezählt wurde, indem 200 Spermien bei 400-facher Vergrößerung und positivem Phasenkontrast beurteilt wurden und der Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel („not curled“) angegeben wurde.

3.3.4 Computer-assisted sperm analysis (CASA)

Die Samenbeurteilung mittels CASA erfolgte mit dem Messsystem SpermVision™ (Minitüb GmbH, Tiefenbach). Parallel zur Schätzung der Spermienbeweglichkeit am Lichtmikroskop wurde eine computergestützte Motilitätsanalyse mit SpermVision™ durchgeführt. Des Weiteren erfolgte eine Viabilitätsanalyse.

3.3.4.1 Aufbau und Funktionsweise des SpermVision™-Systems

Das genutzte SpermVision™-System bestand aus einem Mikroskop (Standard-Labormikroskop BX 41; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) mit negativem Phasenkontrast (Negativ-Hoch-Kontrast-Objektiv; UPlanFINH 20x/0,50 Ph 1; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) und beheizbarem, motorisierten Mikroskop-Kreuztisch (ScanStage), welches über eine Hochgeschwindigkeits-Schwarz/Weiß-Digitalkamera mit hoher Auflösung (60 Frames/Sekunde) mit TV-Adapter mit einem Rechner verbunden war. Auf dem Rechner (Pentium® 4D (Dual Core) Computer mit 3.0 GHz Prozessor und Betriebssystem Microsoft Windows XP Professional, Vista comp. Grafikkarte, 19“ TFT-Monitor) war das SpermVision™-Softwarepaket (Version 3.5.6.2. - Juli 2009) installiert. Weiterhin gehörten eine Heizplatte (HT 200; Minitüb GmbH, Tiefenbach), die in das Steuergerät für den Mikroskopheiztisch integriert war, sowie ein Joystick zur

manuellen Steuerung des Mikroskop-Kreuztisches zur Ausstattung. Für das Viabilitätsmodul kamen des Weiteren eine Farbbildkamera, ein Fluoreszenzmikroskop (Standard-Labormikroskop BX 41 mit Auflicht-Fluoreszenz-System; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) mit Filtermodul für Breitband-Blauanregung (115-230 V/ 50-60 Hz) und ein Quecksilber-Hochdruckbrenner mit Quecksilberdampflampe (Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO®, 50 W/AC L1; Osram GmbH, München) zum Einsatz.

Die Messungen erfolgten in Leja-Messkammern (Leja® Standard Count 4 Chamber Slide; Leja Products B. V., Nieuw Vennep, Niederlande), welche aus einem Objektträger mit jeweils vier Kammern (A-D) mit einer standardisierten Tiefe von 20 µm bestehen.

Nach Beschickung einer Messkammer (siehe unten) bewegte das SpermVision™-System das Präparat zur Beurteilung unter dem Mikroskopobjektiv auf vordefinierte Positionen (Motilitätsanalyse) bzw. es wurden mittels Joystick die entsprechenden Positionen eingestellt (Viabilitätsanalyse). Diese Positionen befanden sich auf der Längsachse genau entlang der Mittellinie im Zentrum der Messkammer. Ziel war es, nicht in den verjüngten Kammerbereichen am hinteren und vorderen Kammerende sowie in den seitlichen Randbereichen zu messen.

Das Messsystem nahm pro Gesichtsfeld innerhalb von 0,5 Sekunden eine Serie von 30 Bildern auf und beurteilte in jedem Bild die Partikel, die der voreingestellten Definition der Spermien (Fläche von 20 bis 60 $µm^2$) entsprachen. Pro Probe wurden jeweils mindestens 4000 Spermien beurteilt. Die gewählten Einstellungen zur Spermienerkennung und zu den Zählkriterien sind dem Anhang (Kap. 9.2) zu entnehmen. Durch Vergleich der 30 Bilder einer Serie wurden die von den Spermien zurückgelegten Wegstrecken erkannt und hieraus die Motilitätsparameter berechnet. Die Spermienkonzentration wurde vom System anhand der erkannten Spermien während der Motilitätsanalyse, des beurteilten Messvolumens und der eventuellen Verdünnung bestimmt. Das Ergebnis der Messung stellte einen Mittelwert aller Motilitäts- und Konzentrationsdaten der einzelnen Gesichtsfelder dar. Die Analyseergebnisse wurden auf dem Bildschirm sowohl graphisch als auch in Zahlenwerten dargestellt. Gleichzeitig erfolgte eine Speicherung der Ergebnisse in den Datenbanken des SpermVision™-Systems.

3.3.4.2 Probenvorbereitung und Befüllung der Messkammer

Vor Beginn der Messung wurden alle Daten des Samenspenders in das SpermVision™-System eingegeben und das Analysefenster geöffnet. Mittels Dropdown-Liste wurden Tierart und Verdünnung ausgewählt. Zur Befüllung der Messkammern wurde eine Pipette (Pipet-Lite® mit LTS®; Rainin Instrument LLC, Oakland, USA) mit einem eingestellten Volumen von 2,5 µl verwendet. Die Pipettenspitzen (bioclean™ Precision Pipette Tips; Rainin Instrument LLC, Oakland, USA) wurden, ebenso wie die Messkammern selbst, vor Gebrauch auf der Heizplatte auf 37°C angewärmt.

Das Gefäß mit dem Sperma wurde vor Entnahme der Probe zur Messung mehrmals geschwenkt, um eine Sedimentation der Spermien auszuschließen. Des Weiteren wurde darauf geachtet, die Probe zentral zu entnehmen. Das vorab eingestellte Volumen wurde entsprechend entnommen und die Messkammer direkt auf dem Mikroskoptisch befüllt. Dazu wurde das in der Pipettenspitze befindliche Sperma kurz vor der zu beschickenden Kammer aus der Pipettenspitze ausgedrückt, sodass sich an der Spitze ein kleiner Tropfen bildete. Dieser wurde dann auf der markierten Eingangsposition der jeweiligen Kammer so abgelegt, dass die Spitze der Pipette solange auf dem Objektträger aufsaß, bis die Kammer vollständig gefüllt war. Die Kammer musste in einem Zug komplett befüllt werden, wobei anschließend keine Flüssigkeit am Ein- und Ausgang überstehen durfte. Ziel war eine Befüllung der Kammer ausschließlich durch Kapillarkräfte. Durch Über- oder Unterfüllung der Messkammer, z. B. durch Injizieren der Probenflüssigkeit schräg unter den Deckglasrand, kann es zu Abweichungen bei der Konzentrationsberechnung kommen. Die vollständige und korrekte Befüllung der Kammer wurde sofort überprüft; Luftblasen oder eine unvollständige Füllung der Kammer führten zum Ausschluss und zur Befüllung einer neuen Kammer.

Um eine Wanderung der Spermien an die Grenzen der Kammer und damit eine Inhomogenität der Probe in der Messkammer zu vermeiden, wurde die Messung innerhalb von 20 Sekunden nach Beschickung der Kammer begonnen und war circa innerhalb von 60 Sekunden nach Kammerbeschickung abgeschlossen.

Bei hoher Dichte des Ejakulates musste dieses für die Messung verdünnt werden. Dazu wurden 10 µl des Spermas in 90 µl auf 37°C angewärmtes Auftaumedium (Rezept siehe Kap. 9.5.1.2) gegeben, woraus sich eine Verdünnung von 1 : 9 ergab. Diese Verdünnung musste dann vor der Messung in das

SpermVision™-System eingegeben werden, um eine korrekte Berechnung der Dichte zu gewährleisten.

Vor Beginn der Messung musste noch die Lichtstärke des Mikroskops eingestellt werden. Hierzu wurde der im SpermVision™-System integrierte Lichtmesser verwendet. Die Zahl unter dem Lichtmesser sollte für eine optimale Spermienerkennung im Bereich zwischen 95 und 100 liegen.

Vor und während der Messung wurden die Probengefäße in einem Thermoblock auf der Heizplatte bei 37°C aufbewahrt.

3.3.4.3 Motilitätsanalyse

Durch den negativen Phasenkontrast erschienen die Spermien weiß auf schwarzem Hintergrund. Die Messung erfolgte bei 200-facher Vergrößerung. Agglutinierte Spermien wurden von der Beurteilung ausgeschlossen. Die beurteilten Samenzellen wurden durch das Messsystem als unbewegliche, lokalbewegliche oder vorwärtsbewegliche Spermien klassifiziert und mittels Overlay farblich markiert (Level 1-Klassifizierung; siehe Kap. 9.2). In einer zweiten Beurteilungsstufe (Level 2-Klassifizierung; siehe Kap. 9.2) wurden Teilpopulationen der vorwärtsbeweglichen Spermien nach ihren Bewegungsmerkmalen wie Hyperaktivität und Linearität unterteilt und die zurückgelegten Wegstrecken ebenfalls farblich markiert. Die Messwerte selbst erschienen auf dem Bildschirm neben dem Mikroskopbild und wurden zugleich in der Datenbank des Systems gespeichert, von wo aus sie später zur weiteren Bearbeitung nach Microsoft Excel exportiert werden konnten. Das vorangehend beschriebene Monitorbild ist in Abb. 4 zu sehen.

Abb. 4: Monitorbild des Programms SpermVision™ nach der Motilitätsanalyse; links ist das Mikroskopbild des zuletzt beurteilten Gesichtsfeldes zu erkennen, rechts die gewählten Einstellungen, die numerischen Ergebnisse der Messung für das aktuelle Feld und die durchschnittlichen numerischen Ergebnisse aller gemessenen Felder

SpermVision™ berechnete die Samendichte und analysierte die Beweglichkeit der Samenzellen mithilfe einer großen Anzahl von Motilitätsparametern. Folgende Parameter wurden von SpermVision™ gemessen bzw. errechnet (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003; Schäfer-Somi und Aurich, 2007; SpermVision™-Benutzerhandbuch 12049/0586):

a) Primäre Parameter:

- Spermienkonzentration in 10^9 Spermien pro ml
- Anteil motiler Spermien in % (Gesamtmotilität; Summe lokalbeweglicher und vorwärtsbeweglicher Spermien)
- Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien in % (Progressive Motilität)
- Anteil lokalbeweglicher Spermien in %
- Anteil unbeweglicher Spermien in %

- DCL (distance curved line) = Kurvenstrecke in µm (tatsächlich zurückgelegte Strecke)
- DAP (distance average path) = durchschnittliche Strecke in µm (Strecke in geglätteter Linie)
- DSL (distance straight line) = gradlinige Strecke in µm
- VCL (velocity curved line) = Geschwindigkeit Kurvenstrecke in µm/s (Geschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn)
- VAP (velocity average path) = Geschwindigkeit durchschnittliche Strecke in µm/s (Geschwindigkeit über die gemittelte Bahn)
- VSL (velocity straight line) = Geschwindigkeit gradlinige Strecke in µm/s (Geschwindigkeit über eine gerade Linie vom Anfang bis zum Ende)
- ALH (amplitude of lateral head displacement) = durchschnittliche seitliche Kopfauslenkung in µm
- BCF (beat cross frequency, frequency of head displacement) = Frequenz der seitlichen oszillatorischen Bewegungen des Spermienkopfes um die mittlere Bahn in Hz
- AOC (average orientation change of the head) = durchschnittlicher Richtungswechsel des Kopfes in °

b) Sekundäre Parameter:

- LIN (linearity, VSL/VCL) = Linearität in % (Gradlinigkeit)
- STR (straightness, VSL/VAP) = Gradlinigkeit in % (Kräftige Gradlinigkeit)
- WOB (wobble, VAP/VCL) = Schwankung der kurvilinearen Strecke um die mittlere Strecke in %

Die Parameter „Anteil lokalbeweglicher Spermien“, „Anteil unbeweglicher Spermien“ und „AOC“ wurden in der Datenbearbeitung dieser Arbeit nicht erfasst.

3.3.4.4 Viabilitätsanalyse

Die Viabilitätsanalyse basierte auf einer Fluoreszenzfärbung der Spermien. Dafür wurde das LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (Invitrogen™ - Molecular Probes™, Eugene, Oregon, USA) eingesetzt, welches aus den Fluoreszenzfarbstoffen SYBR-14 und PI besteht. Beide Farbstoffe binden an die DNA der Zellen und reagieren auf eine Anregung mit sichtbarem Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm durch Fluoreszenzemission. SYBR-14 ist membranpermeabel, penetriert die Membranen von lebenden und toten Zellen und dient als Marker für Zellen mit

einer intakten Plasmamembran. Wenn der Farbstoff an die DNA gebunden ist, liegt das Maximum seiner Fluoreszenzemission bei 516 nm, die Fluoreszenz ist hellgrün. PI wurde für die Gegenfärbung eingesetzt. Es handelt sich hierbei um einen membranimpermeablen Farbstoff, der nur defekte Zellmembranen von geschädigten oder toten Zellen durchdringen kann und in diesen Zellen dann so stark fluoresziert, dass die hellgrüne Fluoreszenz von SYBR-14 nicht mehr sichtbar ist. Sein Maximum der Fluoreszenzemission liegt in an die DNA gebundenem Zustand bei 617 nm, es wird eine starke Rotfluoreszenz abgegeben. Beide Farbstoffe färben nur die Samenzellen an und keine anderen Zellreste. Grün fluoreszierende Spermien stellen somit intakte Spermien dar, während rot fluoreszierende Spermien geschädigt sind (Garner und Johnson, 1995; Produktinformation des Herstellers).

a) Färbung der Proben

Für die Färbung der Proben wurden im Vorfeld der Untersuchungen braune Eppendorf-Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes 0,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg) mit je 2,5 µl der Färbelösung (Herstellungsanleitung siehe Kap. 9.5.3.3) gefüllt und diese bei - 21°C im Gefrierfach gelagert. Vor Gebrauch wurde die Lösung aufgetaut und auf 37°C angewärmt. Zu den 2,5 µl Färbelösung wurden dann mithilfe einer Eppendorf-Pipette (Eppendorf AG, Hamburg) 10 µl Sperma hinzugegeben. Nach kräftigem Schütteln des Reaktionsgefäßes erfolgte anschließend eine Inkubation der Proben für zehn Minuten bei 37°C.

b) Messung

Nach zehnminütiger Inkubationszeit wurde die Leja-Messkammer für die Messung mit SpermVision™ wie oben beschrieben befüllt und dann durch manuelle Steuerung mittels Joystick unter das Mikroskopobjektiv gebracht. Am zuvor auf Fluoreszenzmikroskopie umgestellten Mikroskop (200-fache Vergrößerung) wurde die Blende geöffnet, sodass das Fluoreszenzlicht (sichtbares Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm) auf das Präparat fiel. Das Mikroskopbild wurde auf den Monitor übertragen. Für die Messung der verschiedenen Felder musste das Präparat mittels Joystick vom Untersucher auf die verschiedenen Positionen bewegt werden. Es wurde immer die gleiche Positionsreihenfolge eingehalten. Das Messsystem erkannte grüne Spermien als intakt und rote als defekt. Es erfolgte eine farbliche Identifizierung der Samenzellen mittels Overlay und die Messwerte selbst (Anteile an intakten und geschädigten Spermien in Prozent)

erschienen auf dem Bildschirm neben dem Mikroskopbild und wurden zugleich in der Datenbank des Systems gespeichert, von wo aus sie später zur weiteren Bearbeitung nach Microsoft Excel exportiert werden konnten.

3.4 Weiterverarbeitung des Spermas (Aufbereitung mit den verschiedenen Verdünnern)

Es wurden nur Ejakulate weiterverarbeitet, die eine subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit von mindestens 50 % aufwiesen.

3.4.1 Herstellung der Verdünner

Es kamen zwei nichtkommerzielle Verdünner (TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner und Uppsala Equex-2 System) sowie ein kommerzieller Verdünner (CaniPRO™ Chill 10; Minitüb GmbH, Tiefenbach) zum Einsatz. Alle Verdünner waren eigelbhaltig. Die zur Herstellung verwendeten Geräte und Chemikalien sind dem Anhang (Kap. 9) zu entnehmen.

a) Der TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner (TE) wurde gemäß Rezept (siehe Kap. 9.5.1.1) hergestellt und portioniert in 5 ml Spritzen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verschlossen mit Parafilm® (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA) im Gefrierfach bei - 21°C gelagert. Allerdings wurde abweichend vom Rezept auf den Zusatz antibiotischer Wirkstoffe verzichtet. Vor Gebrauch wurde die entsprechende Menge Verdünner aufgetaut und auf der Heizplatte auf 37°C angewärmt.

b) Beim Uppsala Equex-2 System handelte es sich um ein Verdünnersystem aus zwei Bestandteilen (zweiphasig; Verdünner 1 und 2). Beide Verdünner wurden nach Rezept (siehe Kap. 9.5.1.2) hergestellt und portioniert in 5 ml Spritzen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verschlossen mit Parafilm® (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA) im Gefrierfach bei - 21°C gelagert. Allerdings wurde auch hier abweichend vom Rezept auf den Zusatz antibiotischer Wirkstoffe verzichtet. Vor Gebrauch wurde die entsprechende Menge Verdünner aufgetaut und auf der Heizplatte auf 37°C angewärmt (Verdünner 1) bzw. im Kühlschrank auf eine Temperatur von 4°C (Verdünner 2) gebracht.

c) Der Verdünner CaniPRO™ Chill 10 (Minitüb GmbH, Tiefenbach; CP) wurde gemäß der mitgelieferten Anleitung mit der entsprechenden Menge an Eigelb versetzt und anschließend portioniert in 5 ml Spritzen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verschlossen mit Parafilm® (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA) im Gefrierfach bei - 21°C gelagert. Vor Gebrauch wurde die entsprechende Menge Verdünner aufgetaut und auf der Heizplatte auf 37°C angewärmt. Die Zusammensetzung des Verdünners, wie sie in der Anleitung aufgeführt ist, ist dem Anhang (Kap. 9.5.2) zu entnehmen.

3.4.2 Aliquotierung und Verdünnung des Spermas

Eine graphische Übersicht der Vorgehensweise bei der Aliquotierung und Verdünnung des Spermas ist in der Schemazeichnung (Abb. 5) dargestellt.

Spermagewinnung

↓

Spermabeurteilung

↓

Aufteilung in drei Aliquote

Aliquot 1
Verdünnung mit CaniPRO™ Chill 10

Aliquot 2
Verdünnung mit TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner

Aliquot 3
- Verdünnung mit Uppsala Equex-2 System, Verdünner 1 und 2 (Versuchsteil I)
- Verdünnung mit Uppsala Equex-2 System, nur Verdünner 1 (Versuchsteil II)

Abb. 5: Vorgehensweise bei der Weiterverarbeitung des Spermas

Die spermienreiche Fraktion wurde im Splitsample-Verfahren in drei gleichgroße Volumenanteile (Aliquote 1, 2 und 3) aufgeteilt, welche in auf 37°C vorgewärmte, unten spitz zulaufende Zentrifugenröhrchen aus Glas gegeben wurden. Aliquot 1 wurde entsprechend der Dichte des Nativspermas mit der entsprechenden Menge an CP verdünnt, Aliquot 2 mit der entsprechenden Menge an TE und Aliquot 3

wurde zunächst zentrifugiert, um es dann nach dem Uppsala-Verfahren (Rota et al., 1997; Linde-Forsberg, 2001) aufzuarbeiten.

Für das Uppsala Equex-2 System konnten zwei verschiedene Versuchsteile unterschieden werden: In Versuchsteil I erfolgte die Verdünnung mit dem kompletten Uppsala Equex-2 System, d.h. es wurde dem Sperma erst Verdünner 1 zugesetzt und nach der Äquilibrierungszeit noch Verdünner 2 (Up 1 + 2; n = 12). In Versuchsteil II erfolgte die Verdünnung nur mit Verdünner 1 des Uppsala Equex-2 Systems (Up 1; n = 18).

Die Zentrifugation (Zentrifuge: Heraeus Christ, Labofuge I) erfolgte bei 700 x g (~2000 U/min) für sechs Minuten, der Überstand (das Seminalplasma) wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen und das Sediment (Spermienpellet) im Konus des Röhrchens wurde mit auf 37°C angewärmtem Uppsala Equex-2 System Verdünner 1 im Verhältnis 1 : 2 (ein Anteil Sperma zu zwei Anteilen Verdünner) resuspendiert (Versuchsteile I und II). Darauf folgte eine Äquilibrierung für die Dauer einer Stunde bei 4°C im Kühlschrank in einer Styroporbox. Nach dieser Äquilibrierungsperiode wurde die gleiche Menge an Uppsala Equex-2 System Verdünner 2 (auf 4°C gekühlt) hinzugegeben (Versuchsteil I), wodurch eine Endverdünnung im Verhältnis 1 : 4 entstand.

Für die Verdünner CP und TE galt, dass bei einer Dichte des Nativspermas von bis zu 100.000 Spermien/µl das Aliquot 1 : 2 verdünnt wurde (n = 1), bei einer Dichte von 100.000 bis 650.000 Spermien/µl 1 : 3 (n = 22), bei einer Dichte von 650.000 bis 1.000.000 Spermien/µl 1 : 4 (n = 3) und bei einer Dichte größer als 1.000.000 Spermien/µl 1 : 5 (n = 5). Angestrebt wurde dabei immer eine Endkonzentration im verdünnten Sperma von etwa 100.000 Spermien pro Mikroliter.

Die entsprechende Menge an Verdünner wurde immer in einem gleichmäßigen Strahl an der Innenseite des Zentrifugenröhrchens ablaufen gelassen, wobei das Zentrifugenröhrchen langsam gedreht und geschwenkt wurde, um eine gleichmäßige Durchmischung von Sperma und Verdünner zu erhalten.

Nach der Verdünnung wurden alle Proben für den weiteren Verlauf der Untersuchungen identisch behandelt.

Die verdünnten Spermaproben wurden nach mehrmaligem Schwenken aus den Zentrifugenröhrchen aus Glas in Plastikröhrchen aus Zellkultur-geeignetem Kunststoff mit Schraubverschluss (BD Falcon™, Konisches Röhrchen, 15 ml; BD, Franklin Lakes, USA) überführt, in denen die Lagerung im Kühlschrank bei 4°C

erfolgte. Zur langsameren Temperaturanpassung an die Kühlschranktemperatur sowie zur Vermeidung von Temperaturschwankungen durch Öffnen des Kühlschrankes während der Lagerung wurden die Plastikröhrchen in ein Becherglas (250 ml, Duran®; Schott, Elmsford, USA) mit Leitungswasser von Raumtemperatur verbracht, welches dann in den Kühlschrank gestellt wurde. Dabei wurden die drei zusammengehörigen Röhrchen mit dem Sperma eines Rüden zusammen in einem Becherglas gelagert. Die Röhrchen waren mit dem entsprechenden Verdünner, dem Namen des Rüden und dem Datum der Herstellung beschriftet.
Der Kühlschrank (Typ KD 14505; Miele & Cie. KG, Gütersloh) war auf eine Temperatur von 4°C eingestellt. Für die Dauer der Untersuchungen wurde die Temperatur täglich mittels Thermometer kontrolliert. Die gemessenen Werte schwankten zwischen 3 und 5°C.

3.5 Untersuchung des verdünnten Spermas

Eine graphische Übersicht der Vorgehensweise bei der Untersuchung des verdünnten Spermas ist in Abb. 6 dargestellt.
Das verdünnte Sperma wurde unmittelbar nach der Herstellung (Tag 0) untersucht. Folgende Parameter wurden dabei bestimmt:

- Vorwärtsbeweglichkeit im Deckglaspräparat
- Verhältnis lebender zu toter Spermien (Eosinausstrich)
- Pathomorphologie (Eosinausstrich)
- Anteil an Kopfkappenveränderungen (Spermac®-Färbung)
- Anteil an membrandefekten Samenzellen (HOS-Test)
- Dichte des verdünnten Spermas

Des Weiteren erfolgten eine Motilitäts- sowie eine Viabilitätsanalyse mithilfe des SpermVision™-Systems.

Spermagewinnung

↓

Spermabeurteilung

↓

Aufteilung in drei Aliquote

↓

Aufarbeitung mit den verschiedenen Verdünnern

↓

Untersuchung des verdünnten Spermas unmittelbar nach der Herstellung (Tag 0)
- Vorwärtsbeweglichkeit
- Lebend-Tot-Färbung
- Pathomorphologie
- Spermac®-Färbung
- HOS-Test
- Dichtebestimmung
- SpermVision™: Motilität und Viabilität

Abb. 6: Vorgehensweise bei der Beurteilung des verdünnten Spermas

3.6 Untersuchung der Halteproben

Eine graphische Übersicht der Vorgehensweise bei der Untersuchung der Halteproben ist in der Schemazeichnung (Abb. 7) dargestellt.

Die Untersuchung der Halteproben erfolgte nach Anwärmen eines Aliquotes der jeweiligen Probe im Wasserbad (Typ WNB 45; Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach) für fünf Minuten bei 37°C. Dazu wurden nach mehrmaligem Schwenken der Plastikröhrchen mit einer Eppendorf-Pipette (Eppendorf AG, Hamburg) jeweils 100 µl des verdünnten Spermas entnommen und in beschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden dann in einen Ständer im Wasserbad verbracht und dort für fünf Minuten belassen. Die so erwärmten Proben wurden für die Dauer der Untersuchungen auf der Heizplatte bei 37°C gelagert.

Spermagewinnung

⬇

Spermabeurteilung

⬇

Aufteilung in drei Aliquote

⬇

Aufarbeitung mit den verschiedenen Verdünnern

⬇

Untersuchung des verdünnten Spermas unmittelbar nach der Herstellung (Tag 0)

⬇

Untersuchung der Halteproben
- 24 Stunden nach Herstellung (Tag 1)
- 48 Stunden nach Herstellung (Tag 2)
- 72 Stunden nach Herstellung (Tag 3)
- 120 Stunden nach Herstellung (Tag 5)
- 168 Stunden nach Herstellung (Tag 7)
- 240 Stunden nach Herstellung (Tag 10)
- jeweils untersuchte Parameter:
  - Vorwärtsbeweglichkeit
  - Lebend-Tot-Färbung
  - Pathomorphologie
  - Spermac®-Färbung
  - SpermVision™: Motilität und Viabilität

Abb. 7: Vorgehensweise bei der Untersuchung der Halteproben

Die Untersuchungen der Halteproben erfolgten nach 24 Stunden (Tag 1), nach 48 Stunden (Tag 2), nach 72 Stunden (Tag 3), nach 120 Stunden (Tag 5), nach 168 Stunden (Tag 7) und nach 240 Stunden (Tag 10) nach Herstellung des verdünnten Spermas.

Folgende Parameter wurden dabei bestimmt:

- Vorwärtsbeweglichkeit im Deckglaspräparat
- Verhältnis lebender zu toter Spermien (Eosinausstrich)
- Pathomorphologie (Eosinausstrich)
- Anteil an Kopfkappenveränderungen (Spermac®-Färbung)

Des Weiteren erfolgten eine Motilitäts- sowie eine Viabilitätsanalyse mithilfe des SpermVision™-Systems.

3.7 Statistische Methoden

Die Datensätze wurden unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft® Office Exel 2007 (Microsoft Corporation) verwaltet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Dabei wurden folgende Programme des Statistikprogrammpaketes BMDP/Dynamic, Release 8.1 (1993; BMDP Statistical Software Inc.) verwendet: BMDP1D (einfache Datenbeschreibung), BMDP1R (Wahrscheinlichkeitsplots zur Prüfung auf Normalverteilung), BMDP2V (ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalysen mit Messwiederholungen) und BMDP6D (Korrelationsanalysen). Des Weiteren kam für den Student-Newman-Keuls-Test ein Eigenprogramm der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zum Einsatz. Die graphischen Abbildungen der gewonnenen Daten wurden ebenfalls mit dem Programm Microsoft® Office Exel 2007 (Microsoft Corporation) erstellt.
Bei qualitativen Merkmalen (Farbe, Geruch, Konsistenz, makroskopische Beimengungen, Agglutinationen, mikroskopische Beimengungen) wurde die Merkmalsausprägung als prozentualer Anteil bezogen auf alle Nativejakulate und als totale Anzahl (n) angegeben.
Bei quantitativen, annähernd normalverteilten Merkmalen (Volumen, pH-Wert, subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit, CASA-Gesamtmotilität, CASA-Vorwärtsbeweglichkeit, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, STR, LIN, WOB) erfolgte die einfache Datenbeschreibung anhand des arithmetischen Mittelwertes ($\bar{x}$), der Standardabweichung (SD), des Minimums (Min.) und des Maximums (Max.) in der Form $\bar{x} \pm$ SD (Min., Max.).
Zur Prüfung, ob ein quantitatives Merkmal über die zu vergleichenden Messwiederholungen hinweg annähernd normalverteilt ist, wurden unter Verwendung des Programms BMDP1R die Residuen berechnet, welche dann mittels des Wahrscheinlichkeitsplots auf Normalverteilung überprüft wurden. Lag keine Normalverteilung vor, wurden die Originaldaten numerisch transformiert, um

dann mit diesen transformierten Werten die gleiche Prozedur zu wiederholen. Auf diese Art konnten die am besten geeigneten Datentransformationen identifiziert werden. Zum Einsatz kamen die Wurzeltransformation, die Arcus-Sinus-Transformation und die logarithmische Transformation der Daten.

Bei nicht-normalverteilten Merkmalen, bei denen die Originaldaten durch die Wurzeltransformation numerisch transformiert wurden (Dichte Neubauer-Zählkammer, CASA-Dichte), sowie bei nicht-normalverteilten Merkmalen, bei denen die Originaldaten durch die Arcus-Sinus-Transformation numerisch transformiert wurden (Anteil lebender Spermien im Eosinausstrich, CASA-Viabilität), wurden die rücktransformierten Mittelwerte ($\bar{x}_r$; „modifizierter Mittelwert"), die rücktransformierten Mittelwerte minus bzw. plus der Standardabweichung vor Rücktransformation ($(\bar{x} – SD)_r$, $(\bar{x} + SD)_r$; „modifizierter 1-s-Bereich"), Minimum (Min.) und Maximum (Max.) in der Form $\bar{x}_r$ ($(\bar{x} – SD)_r$ - $(\bar{x} + SD)_r$; Min., Max.) dargestellt.

Bei positiven quantitativen Merkmalen mit rechtsschiefer Verteilung, bei denen die Originaldaten logarithmisch transformiert wurden (Gesamtanteil morphologisch veränderter Samenzellen, Kopf-, Hals-, Schwanzveränderungen, lose Köpfe und Plasmatropfen im Eosinausstrich, Gesamtanteil an Kopfkappenveränderungen und abgelöste Kopfkappen in der Spermac®-Färbung, Anteil an nicht aufgerollten Geißeln im HOS-Test), erfolgte die einfache Datenbeschreibung durch Angabe von geometrischem Mittelwert ($\bar{x}_g$), Streufaktor (SF), Minimum (Min.) und Maximum (Max.) in der Form $\bar{x}_g$ (SF; Min., Max.). Bei graphischen Abbildungen wurden diese in Form von Intervallen ($\bar{x}_g$ x SF; $\bar{x}_g$/SF) dargestellt ($\bar{x}_g$ (SF)).

Zur Beurteilung der morphologischen Veränderungen wurden folgende Gruppen zusammengefasst: Kopf-, Hals-, Schwanzveränderungen, lose Köpfe und Plasmatropfen. Aus der Summe aller Veränderungen wurde der Gesamtprozentsatz morphologisch veränderter Samenzellen ermittelt.

Zur statistischen Prüfung des Verdünnereinflusses der drei bzw. vier verschiedenen Verdünner auf die untersuchten Spermaparameter (im Vergleich mit Nativsperma an Tag 0) auf Signifikanz wurden einfaktorielle Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner" durchgeführt. Bei signifikanten Ergebnissen wurden die Werte im Anschluss an die Varianzanalyse paarweise mit dem Student-Newman-Keuls-Test (paarweiser Mittelwertvergleich nach Student-Newman-Keuls) verglichen.

Zur statistischen Prüfung des Verdünner- und Zeiteinflusses auf die untersuchten Spermaparameter während des Untersuchungszeitraumes von zehn Tagen auf Signifikanz wurden zweifaktorielle Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich der Faktoren „Verdünner“ (drei bzw. vier verschiedene Verdünner) und „Zeit“ (Untersuchungszeitpunkte: Tage 0, 1, 2, 3, 5, 7 und 10) eingesetzt. Es wurden alle Verdünner jeweils paarweise miteinander verglichen. Dabei prüft der „Haupteffekt Verdünner“ (p_{Verd}), ob hinsichtlich der untersuchten Parameter zwischen den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten gemittelt über alle Mittelwerte ein Niveauunterschied besteht und der „Haupteffekt Zeit“ (p_{Zeit}), ob insgesamt ein Zeiteinfluss nachgewiesen werden kann, oder anders ausgedrückt, ob im Durchschnitt über alle verdünnten Ejakulate die Mittelwerte der untersuchten Parameter konstant bleiben. Darüber hinaus prüft die „Wechselwirkung“ (p_W), ob die Zeitverläufe zwischen den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten parallel bzw. gleichsinnig sind.
Zur Beurteilung der Zusammenhänge zwischen den subjektiv bestimmten und den objektiv mittels CASA gemessenen Werten wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Hierbei wurden alle zeitgleichen Variablenpaare (subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit und mittels CASA bestimmte Vorwärtsbeweglichkeit; Anteil lebender Spermien im Eosinausstrich und mittels CASA gemessene Viabilität nach SYBR-14/PI-Färbung) zunächst nach Verdünnern getrennt und dann ohne Trennung nach Verdünnern (explorativ) vergleichend untersucht. Weiterhin wurden auch zur Beurteilung der Zusammenhänge zwischen verschiedenen Spermaparametern Korrelationsanalysen durchgeführt. Auch hier erfolgten die Analysen zunächst nach Verdünnern getrennt und dann ohne Trennung nach Verdünnern (explorativ).
Der durch die Korrelationsanalysen ermittelte Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) stellt eine Maßzahl für die Straffheit des linearen Zusammenhangs zwischen zwei quantitativen Merkmalen dar, oder anders formuliert eine Maßzahl, die angibt, wie eng der lineare Zusammenhang zwischen den Messwerten ist.
Die Bewertung der statistischen Signifikanzen erfolgte unter Zugrundelegung des Signifikanzniveaus $\alpha = 0{,}05$, was bedeutet, dass Ergebnisse mit $p \leq 0{,}05$ als statistisch signifikant angesehen wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungsergebnisse der Nativejakulate

In diesem Kapitel werden die Untersuchungsergebnisse der Nativejakulate (n = 30) wiedergegeben. Dabei bezieht sich die Bezeichnung „Ejakulat“ auf die spermienreiche Fraktion.

4.1.1 Makroskopische Untersuchung

Das mittlere Volumen der spermienreichen Fraktion betrug 2,9 ± 1,3 ml (Min. 1,5 ml, Max. 7,0 ml). Die Farbe der Ejakulate war zu 73,3 % (n = 22) weiß, zu 23,3 % (n = 7) weißlich und zu 3,3 % (n = 1) weißlich-rötlich. Alle Ejakulate wiesen einen tierartspezifischen Geruch ohne besonderen Befund auf. Die Konsistenz der spermienreichen Fraktion war bei 10,0 % (n = 3) der Proben sahnig, bei 50,0 % (n = 15) milchig, bei 36,7 % (n = 11) molkig und bei 3,3 % (n = 1) wässrig. Im Ejakulat eines Rüden (3,3 %) ließ sich eine Beimengung in Form von Blut finden.

4.1.2 Chemisch-physikalische Untersuchung

Der pH-Wert lag bei allen untersuchten Ejakulaten innerhalb des Referenzbereiches von 6,2 bis 7,2 (Hoffmann, 2003d) und betrug im Durchschnitt 6,4 ± 0,1 (Min. 6,2, Max. 6,7).

4.1.3 Mikroskopische Untersuchung

Die geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit der Ejakulate lag im Mittel bei 80,8 ± 9,5 % (Min. 50,0 %, Max. 90,0 %).
Der prozentuale Anteil lebender Spermien im Ejakulat betrug nach Anwendung der Arcus-Sinus-Transformation im Mittel 87,4 % (80,6-92,9 %; Min. 70,0 %, Max. 96,0 %). Durchschnittlich wurden 10,3 % (SF = 1,66; Min. 4,0 %, Max. 37,0 %) morphologisch veränderte Samenzellen gefunden. Hierbei handelte es sich bei 0,3 % (SF = 1,52; Min. 0,0 %, Max. 1,5 %) um Kopfveränderungen, bei 0,4 % (SF = 1,96; Min. 0,0 %, Max. 2,5 %) um Halsveränderungen, bei 5,9 % (SF = 2,09; Min. 1,5 %, Max. 34,5 %) um Schwanzveränderungen, bei 1,8 % (SF = 2,57; Min. 0,0 %, Max. 8,5 %) um lose Köpfe und bei 0,6 % (SF = 2,30; Min. 0,0 %, Max. 5,0 %) um Plasmatropfen.

Die mittlere Dichte der spermienreichen Fraktion lag nach Anwendung der Wurzeltransformation bei 496,6 Mio. Spermien/ml (230,6-863,5 Mio./ml, Min. 60,0 Mio./ml, Max. 1450,0 Mio./ml).
Eine Agglutination der Spermien konnte in einem Ejakulat (3,3 %) nachgewiesen werden. Mikroskopische Beimengungen wurden bei 13,3 % der Ejakulate (n = 4) gefunden. Dabei handelte es sich in einer Probe (3,3 %) um Zellen der Spermatogenese (+) und in drei Proben (10,0 %) um Prostasomen (+: n = 1; ++: n = 1; +++: n = 1).

4.1.4 Spermac®-Färbung

Der Anteil an Samenzellen mit Kopfkappenveränderungen betrug 2,7 % (SF = 2,63; Min. 0,0 %, Max. 13,5 %). Hierbei konnte bei 1,4 % (SF = 2,67; Min. 0,0 %, Max. 5,0 %; n = 22) der Samenzellen ein Verlust des Akrosoms (abgelöste Kopfkappe) nachgewiesen werden.

4.1.5 HOS-Test

Der HOS-Test zeigte bei 3,1 % (SF = 2,34; Min. 0,5 %, Max. 16,5 %) der Spermien eine nicht aufgerollte Geißel („not curled“).

4.1.6 Computer-assisted sperm analysis (CASA)

Die durchschnittliche Dichte der spermienreichen Fraktion lag nach Anwendung der Wurzeltransformation bei 171,9 Mio. Spermien/ml (60,4-340,4 Mio./ml, Min. 10,9 Mio./ml, Max. 615,4 Mio./ml).

4.1.6.1 Motilitätsanalyse

Mittels CASA wurden eine durchschnittliche Gesamtmotilität von 70,9 ± 18,1 % (Min. 30,7 %, Max. 95,6 %) und eine durchschnittliche Vorwärtsbeweglichkeit von 65,0 ± 19,9 % (Min. 22,1 %, Max. 89,5 %) ermittelt. Die Messergebnisse weiterer durch CASA bestimmter Motilitätsparameter (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis) sind in der folgenden Tabelle (Tab. 7) aufgeführt.

Tab. 7: Messergebnisse der einzelnen durch CASA (SpermVision™-System) bestimmten Motilitätsparameter in den Nativejakulaten (n = 30); dargestellt durch Angabe von arithmetischem Mittelwert ($\bar{x}$), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.) und Maximum (Max.)

Parameter	$\bar{x}$ ± SD	Min.	Max.
DAP (µm)	41,6 ± 8,7	23,7	53,9
DCL (µm)	61,9 ± 11,6	42,6	85,1
DSL (µm)	35,1 ± 9,1	14,9	50,0
VAP (µm/s)	97,4 ± 20,4	55,2	123,7
VCL (µm/s)	144,9 ± 27,5	97,9	199,9
VSL (µm/s)	82,5 ± 21,3	33,9	112,9
ALH (µm)	5,7 ± 1,0	3,5	7,9
BCF (Hz)	26,2 ± 3,4	20,5	34,5
STR (VSL/VAP) (%)	83,4 ± 8,1	61,0	92,0
LIN (VSL/VCL) (%)	56,6 ± 11,6	27,0	76,0
WOB (VAP/VCL) (%)	67,0 ± 8,4	45,0	82,0

4.1.6.2 Viabilitätsanalyse

Die nach SYBR-14/PI-Färbung gemessene Viabilität der Spermien in den Nativejakulaten betrug nach Anwendung der Arcus-Sinus-Transformation im Durchschnitt 82,7 % (71,0-91,9 %; Min. 57,4 %, Max. 97,1 %).

4.2 Ergebnisse der weiterverarbeiteten Ejakulate unmittelbar nach dem Verdünnen an Tag 0

Voraussetzung für die Weiterverarbeitung der spermienreichen Fraktion war eine geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit von mindestens 50 % (siehe Kap. 3.4), die von allen 30 Probanden erfüllt wurde.

Nach vollständiger Aufarbeitung des Spermas mit den verschiedenen Verdünnern erfolgte vor der endgültigen Kühlung eine Untersuchung der verdünnten Ejakulate. Diese diente der Erfassung der durch das Verdünnen auftretenden Effekte. Die unmittelbar nach dem Verdünnen der spermienreichen Fraktion untersuchten Parameter waren die gleichen wie bei Untersuchung der Nativejakulate. Dadurch wurde ein direkter Vergleich zwischen den verschiedenen Verdünnern hinsichtlich ihres Einflusses auf die Spermaqualität möglich.

4.2.1 Dichten der verdünnten Ejakulate

4.2.1.1 Neubauer-Zählkammer

Die durchschnittlichen mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmten Dichten der verdünnten Ejakulate sind in Tab. 8 wiedergegeben.

Tab. 8: Durchschnittliche mittels Neubauer-Zählkammer bestimmte Dichten der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate nach Anwendung der Wurzeltransformation; dargestellt durch Angabe von „modifiziertem Mittelwert“ ($\bar{x}_r$), „modifiziertem 1-s-Bereich“ (1-s-Bereich), Minimum (Min.) und Maximum (Max.)

Verdünner	n	$\bar{x}_r$ (x 10^6/ml)	1-s-Bereich (x 10^6/ml)	Min. (x 10^6/ml)	Max. (x 10^6/ml)
CP	30	76,0	43,0-118,3	20,0	150,0
TE	30	80,6	45,3-126,0	25,0	160,0
Up 1 + 2	12	84,7	52,2-125,1	35,0	135,0
Up 1	18	127,3	86,1-176,6	60,0	205,0

4.2.1.2 CASA

Die durchschnittlichen mittels CASA bestimmten Dichten der verdünnten Ejakulate sind in Tab. 9 wiedergegeben.

Tab. 9: Durchschnittliche mittels CASA (SpermVision™-System) bestimmte Dichten der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate nach Anwendung der Wurzeltransformation; dargestellt durch Angabe von „modifiziertem Mittelwert“ ($\bar{x}_r$), „modifiziertem 1-s-Bereich“ (1-s-Bereich), Minimum (Min.) und Maximum (Max.)

Verdünner	n	$\bar{x}_r$ (x 10^6/ml)	1-s-Bereich (x 10^6/ml)	Min. (x 10^6/ml)	Max. (x 10^6/ml)
CP	30	71,8	37,6-117,0	19,8	177,6
TE	30	77,7	40,5-126,7	24,8	205,4
Up 1 + 2	12	66,8	40,9-99,1	25,5	115,3
Up 1	18	127,9	80,0-187,1	53,6	227,9

4.2.2 Einfluss der Verdünner auf die Motilität an Tag 0

Nach Zugabe der verschiedenen Verdünner zu den Nativejakulaten konnte eine tendenzielle Abnahme fast aller untersuchten Motilitätsparameter beobachtet werden.

4.2.2.1 Subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit

Die durchschnittliche subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit der Nativejakulate und der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) ist in Tab. 10 dargestellt. Durch alle Verdünner kam es, verglichen mit dem Nativsperma, zu einer leichten Reduktion der im Mittel geschätzten Motilitätswerte. Die geringsten Motilitätsabnahmen unmittelbar nach dem Verdünnen waren in den mit CP und TE aufgearbeiteten Ejakulaten zu beobachten, die stärksten in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten, wenn auch der Unterschied sich als nicht signifikant erwies.

Tab. 10: Subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit (n, $\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0

Verdünner	n	$\bar{x} \pm SD$ (%)	Min. (%)	Max. (%)
keiner (Nativsperma)	30	80,8 ± 9,5	50,0	90,0
CP	30	77,8 ± 11,4	50,0	90,0
TE	30	77,2 ± 14,3	40,0	90,0
Up 1 + 2	12	73,8 ± 18,0	40,0	90,0
Up 1	18	75,8 ± 13,8	40,0	90,0

An Tag 0, unmittelbar nach dem Verdünnen, konnte in der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner“ bei Betrachtung der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit kein signifikanter Unterschied zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE sowie Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelt werden ($n = 12$; $p = 0{,}43$). Auch zwischen dem Nativsperma, den mit CP und den mit TE verdünnten Proben ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen ($n = 30$; $p = 0{,}084$). Lediglich zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der mittleren subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit beobachtet werden ($n = 18$; $p = 0{,}03$). Beim anschließenden paarweisen Vergleich der Mittelwerte (Student-Newman-Keuls-Test) zeigte sich, dass sich nur die geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten signifikant von der in den Nativejakulaten unterschied ($p < 0{,}05$). Die Unterschiede der anderen Verdünner zum Nativsperma und auch der Verdünner untereinander waren nicht signifikant.

4.2.2.2 Mittels CASA gemessene Gesamtmotilität

Die durchschnittliche mittels CASA bestimmte Gesamtmotilität der Ejakulate vor und unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) ist in Abb. 8 dargestellt. Im Gegensatz zur subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit, bei der es durch alle Verdünner zu einer Motilitätsabnahme unmittelbar nach dem Verdünnen kam, konnte bei der CASA-Gesamtmotilität beim Vergleich der Messwerte der verdünnten Ejakulate mit denen des Nativspermas nur bei den mit CP und Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten eine Reduktion der Motilität beobachtet werden. Der Motilitätsabfall war in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten am stärksten ausgeprägt. In den mit TE verdünnten Ejakulaten blieb die durchschnittliche CASA-Gesamtmotilität nahezu konstant und in den mit Up 1 verdünnten Proben konnte sogar eine Zunahme der mittleren CASA-Gesamtmotilität festgestellt werden. Allerdings konnte für keine der genannten Veränderungen eine statistische Signifikanz belegt werden.

Abb. 8: Prozentsatz an motilen Samenzellen (mittels Computer-assisted sperm analysis (CASA; SpermVision™-System) gemessene Gesamtmotilität; $\bar{x} \pm SD$) im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0; CP = Verdünner CaniPRO™ Chill 10, TE = TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner, Up 1 + 2 = Uppsala Equex-2 System (Verdünner 1 und Verdünner 2), Up 1 = Uppsala Equex-2 System (nur Verdünner 1), n = Probenanzahl

Unmittelbar nach dem Verdünnen konnte in der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner“ kein signifikanter Unterschied der durchschnittlichen CASA-Gesamtmotilität zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE sowie Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelt werden ($n = 12$; $p = 0,12$). Auch zwischen dem Nativsperma, den mit CP und den

mit TE verdünnten Proben ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen ($n = 30$; $p = 0,41$). Zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten konnte jedoch ein signifikanter Unterschied der durchschnittlichen mittels CASA bestimmten Gesamtmotilität verifiziert werden ($n = 18$; $p = 0,036$). Der folgende paarweise Vergleich nach Student-Newman-Keuls ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den mittleren CASA-Gesamtmotilitäten in den mit CP und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten ($p < 0,05$), wobei der Mittelwert in Up 1 (75,5 ± 11,8 %) höher lag als in CP (68,3 ± 13,7 %). Zwischen den Nativejakulaten und den verschiedenen Verdünnern sowie zwischen den Verdünnern CP und TE bzw. TE und Up 1 ließen sich keine weiteren signifikanten Unterschiede feststellen.

4.2.2.3 Mittels CASA gemessene Vorwärtsbeweglichkeit

Die durchschnittliche mittels CASA bestimmte Vorwärtsbeweglichkeit der Nativejakulate und der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) ist in Abb. 9 dargestellt. Wie bei der CASA-Gesamtmotilität kam es auch bei der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit beim Vergleich der Messwerte der verdünnten Ejakulate mit denen des Nativspermas in den mit CP und Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten zu einer Reduktion der Motilität. Ebenso konnte in den mit TE aufgearbeiteten Ejakulaten ein Motilitätsabfall unmittelbar nach dem Verdünnen beobachtet werden. Die stärkste Abnahme der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit fand in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten statt. In den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten ließ sich dagegen eine tendenzielle Zunahme der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit feststellen. Auch hier konnten jedoch keine statistischen Signifikanzen für die beobachteten Veränderungen nachgewiesen werden.

Abb. 9: Prozentsatz an vorwärtsbeweglichen Samenzellen (mittels Computer-assisted sperm analysis (CASA; SpermVision™-System) gemessene Vorwärtsbeweglichkeit; $\bar{x} \pm SD$) im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0; CP = Verdünner CaniPRO™ Chill 10, TE = TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner, Up 1 + 2 = Uppsala Equex-2 System (Verdünner 1 und Verdünner 2), Up 1 = Uppsala Equex-2 System (nur Verdünner 1), n = Probenanzahl

An Tag 0 konnte in der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner“ bei Betrachtung der durchschnittlichen CASA-Vorwärtsbeweglichkeit kein signifikanter Unterschied zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE sowie Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelt werden ($n = 12$; $p = 0,12$). Auch zwischen dem Nativsperma, den mit CP und den mit TE verdünnten Proben ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen ($n = 30$; $p = 0,15$). Zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten konnte ein signifikanter Unterschied der im Mittel durch CASA gemessenen Vorwärtsbeweglichkeit nachgewiesen werden ($n = 18$; $p = 0,022$). Der im Anschluss an die Varianzanalyse durchgeführte paarweise Vergleich nach Student-Newman-Keuls zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den mittleren CASA-Vorwärtsbeweglichkeiten in den mit CP und Up 1 verdünnten Ejakulaten auf ($p < 0,05$), wobei der Mittelwert in Up 1 (68,2 ± 13,7 %) über dem in CP (59,8 ± 17,1 %) lag. Zwischen den Nativejakulaten und den verschiedenen Verdünnern sowie zwischen den Verdünnern CP und TE bzw. TE und Up 1 ließen sich keine weiteren signifikanten Unterschiede feststellen.

4.2.2.4 Weitere mittels CASA bestimmte Motilitätsparameter

Im Folgenden werden weitere durch CASA (SpermVision™-System) bestimmte Motilitätsparameter (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis) der

Nativejakulate und der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) dargestellt. Da das SpermVision™-System eine Vielzahl an Motilitätsparametern misst bzw. errechnet, sollen hier nur die Messergebnisse für einige ausgewählte Parameter (VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, LIN) wiedergegeben werden. Eine ausführliche Darstellung der Messergebnisse für alle CASA-Motilitätsparameter (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, STR, LIN, WOB) der Nativejakulate und der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) findet sich im Anhang (Tab. A5, Kap. 9.8).

Bei den Streckenparametern (DAP, DCL, DSL) war im Vergleich mit dem Nativsperma in allen verdünnten Ejakulaten unmittelbar nach Zugabe der Verdünner eine Abnahme der durchschnittlich bestimmten Messwerte zu beobachten. Dabei zeigten sich in mit CP verdünnten Proben für alle drei Streckenparameter die geringsten und in mit Up 1 + 2 verdünnten Proben für alle drei Parameter die stärksten Abnahmen.

Für die Geschwindigkeitsparameter (VAP, VCL, VSL) konnten die gleichen Beobachtungen gemacht werden. Die nachstehenden Tabellen (Tab. 11-13) geben die durchschnittlichen mittels CASA bestimmten Werte der Motilitätsparameter VAP, VCL und VSL der Ejakulate vor und unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) wieder.

Aus Tab. 11 ist ersichtlich, dass die verdünnten Ejakulate im Vergleich mit dem Nativsperma alle eine Abnahme der Mittelwerte des Motilitätsparameters VAP zeigten. Dabei konnte in den mit CP verdünnten Proben die geringste Abnahme beobachtet werden und in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben die stärkste.

Tab. 11: CASA-Motilitätsparameter VAP (n, $\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0

Verdünner	n	$\bar{x} \pm SD$ (µm/s)	Min. (µm/s)	Max. (µm/s)
keiner (Nativsperma)	30	97,4 ± 20,4	55,2	123,7
CP	30	90,9 ± 16,0	54,1	113,0
TE	30	87,8 ± 15,4	51,2	119,5
Up 1 + 2	12	72,2 ± 12,6	52,7	89,5
Up 1	18	83,8 ± 10,4	53,9	94,6

Unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) konnte in der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner“ für VAP ein signifikanter Unterschied zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE sowie Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelt werden ($n = 12$; $p = 0{,}0004$). Beim paarweisen Vergleich mit dem Student-Newman-Keuls-Test ergaben sich hinsichtlich des Parameters VAP signifikante Unterschiede zwischen dem Nativsperma und den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten ($p < 0{,}01$), zwischen den mit CP und den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben ($p < 0{,}01$) und zwischen den mit TE und den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten ($p < 0{,}01$) (siehe Tab. A6, Kap. 9.8).
Auch zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten konnte unmittelbar nach dem Verdünnen in der einfaktoriellen Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied für VAP nachgewiesen werden ($n = 18$; $p < 0{,}0001$). Der folgende paarweise Vergleich nach Student-Newman-Keuls ergab signifikante Unterschiede zwischen dem Nativsperma und den mit den Verdünnern CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten (jeweils mit $p < 0{,}01$). Ebenso unterschieden sich bei Betrachtung des Parameters VAP die Verdünner CP und Up 1 ($p < 0{,}01$) und die Verdünner TE und Up 1 ($p < 0{,}01$) signifikant voneinander. Zwischen den Verdünnern CP und TE konnte mit dem Student-Newman-Keuls-Test kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (siehe Tab. A7, Kap. 9.8).
Weiterhin ließ sich unmittelbar nach dem Verdünnen mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied für VAP zwischen dem Nativsperma, den mit CP und den mit TE verdünnten Proben nachweisen ($n = 30$; $p = 0{,}0001$). Der im Anschluss durchgeführte paarweise Vergleich nach Student-Newman-Keuls zeigte signifikante Unterschiede zwischen dem Nativsperma und den mit CP verdünnten Proben ($p < 0{,}01$) und zwischen dem Nativsperma und den mit TE verdünnten Proben ($p < 0{,}01$) auf. Die mit CP und TE aufgearbeiteten Ejakulate unterschieden sich bezüglich des Parameters VAP nicht signifikant voneinander (siehe Tab. A8, Kap. 9.8).

Die durchschnittlichen mittels CASA bestimmten Werte des Motilitätsparameters VCL der Ejakulate vor und unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) werden in Tab. 12 dargestellt. Auch hier ließ sich im Vergleich mit dem Nativsperma in allen verdünnten Ejakulaten unmittelbar nach Zugabe der Verdünner eine Abnahme der Mittelwerte des Motilitätsparameters VCL beobachten. In den mit CP und mit TE

verdünnten Ejakulaten war die Reduktion am geringsten ausgeprägt, in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten am stärksten.

Tab. 12: CASA-Motilitätsparameter VCL (n, $\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0

Verdünner	n	$\bar{x} \pm SD$ (µm/s)	Min. (µm/s)	Max. (µm/s)
keiner (Nativsperma)	30	144,9 ± 27,5	97,9	199,9
CP	30	127,0 ± 16,5	90,2	153,7
TE	30	126,8 ± 18,7	85,8	167,8
Up 1 + 2	12	109,1 ± 13,8	90,3	131,4
Up 1	18	123,1 ± 15,7	79,4	144,9

In den einfaktoriellen Varianzanalysen und den paarweisen Vergleichen nach Student-Newman-Keuls konnten für VCL signifikante Unterschiede zwischen dem Nativsperma und den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten nachgewiesen werden (jeweils mit $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Auch zwischen den mit CP und den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben sowie zwischen den mit TE und den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben konnten signifikante Unterschiede ermittelt werden (jeweils mit $p < 0,01$). Zwischen den übrigen Verdünnerpaaren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Tab. A6-A8, Kap. 9.8).

Tab. 13 zeigt die durch CASA bestimmten Mittelwerte des Motilitätsparameters VSL der Nativejakulate und der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0). Verglichen mit den Nativejakulaten kam es durch die Zugabe der Verdünner in allen verdünnten Ejakulaten zu einer Reduktion der durchschnittlich gemessenen VSL. In den mit CP verdünnten Proben war die Abnahme am geringsten und in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben am stärksten.

Tab. 13: CASA-Motilitätsparameter VSL (n, $\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0

Verdünner	n	$\bar{x} \pm SD$ (µm/s)	Min. (µm/s)	Max. (µm/s)
keiner (Nativsperma)	30	82,5 ± 21,3	33,9	112,9
CP	30	76,2 ± 15,7	39,2	101,7
TE	30	71,8 ± 14,8	40,3	105,5
Up 1 + 2	12	60,7 ± 13,1	40,9	82,5
Up 1	18	66,3 ± 9,4	45,8	79,7

In den einfaktoriellen Varianzanalysen und den paarweisen Vergleichen nach Student-Newman-Keuls konnten für VSL signifikante Unterschiede zwischen dem Nativsperma und den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten nachgewiesen werden (jeweils mit $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Die verdünnten Ejakulate untereinander unterschieden sich bezüglich des CASA-Motilitätsparameters VSL nur teilweise. So waren lediglich die Unterschiede zwischen den mit CP und den mit Up 1 verdünnten Proben ($p < 0,01$) sowie die zwischen den mit TE und den mit Up 1 verdünnten Proben ($p < 0,01$) als signifikant zu bewerten (Tab. A6-A8, Kap. 9.8).

Die folgende Tabelle (Tab. 14) gibt die durchschnittlichen mittels CASA bestimmten Werte des Motilitätsparameters ALH der Ejakulate vor und unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) wieder. Auch bei diesem Parameter fiel auf, dass es in den verdünnten Ejakulaten im Vergleich mit dem Nativsperma stets zu einer Abnahme der Mittelwerte kam. Hier konnte allerdings in den mit Up 1 verdünnten Proben die geringste Reduktion gesehen werden und aber wieder in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben die stärkste.

Tab. 14: CASA-Motilitätsparameter ALH (n, $\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0

Verdünner	n	$\bar{x} \pm SD$ (µm)	Min. (µm)	Max. (µm)
keiner (Nativsperma)	30	5,7 ± 1,0	3,5	7,9
CP	30	5,2 ± 0,8	3,6	6,8
TE	30	5,4 ± 0,9	3,4	7,5
Up 1 + 2	12	4,4 ± 0,6	3,4	5,4
Up 1	18	5,5 ± 0,8	3,8	6,7

In den einfaktoriellen Varianzanalysen und den paarweisen Vergleichen nach Student-Newman-Keuls bestanden bezüglich des Parameters ALH signifikante Unterschiede zwischen dem Nativsperma und den mit CP ($p < 0,05$) sowie den mit Up 1 + 2 ($p < 0,01$) aufgearbeiteten Ejakulaten. Auch zwischen den mit CP und den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben sowie zwischen den mit TE und den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben konnten signifikante Unterschiede ermittelt werden (jeweils mit $p < 0,01$). Die mit den Verdünnern CP und TE aufgearbeiteten Ejakulate zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tab. A6-A8, Kap. 9.8).

Die durchschnittlichen mittels CASA bestimmten Werte des Motilitätsparameters BCF der Nativejakulate und der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) werden in Tab. 15 wiedergegeben. Verglichen mit dem Nativsperma konnte unmittelbar nach Zugabe der Verdünner in allen verdünnten Ejakulaten eine Abnahme der Mittelwerte beobachtet werden. Dabei war die Abnahme, im Gegensatz zu allen anderen Motilitätsparametern, in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten am geringsten ausgeprägt und in den mit TE verdünnen Proben am stärksten.

Tab. 15: CASA-Motilitätsparameter BCF (n, $\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0

Verdünner	n	$\bar{x} \pm SD$ (Hz)	Min. (Hz)	Max. (Hz)
keiner (Nativsperma)	30	26,2 ± 3,4	20,5	34,5
CP	30	24,0 ± 2,7	19,7	30,6
TE	30	23,1 ± 2,4	19,7	29,7
Up 1 + 2	12	24,9 ± 3,1	21,2	31,2
Up 1	18	23,6 ± 2,7	19,5	29,1

In den einfaktoriellen Varianzanalysen und den paarweisen Vergleichen nach Student-Newman-Keuls konnten für BCF signifikante Unterschiede zwischen dem Nativsperma und den mit CP, TE sowie Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelt werden (jeweils mit $p < 0,01$). Die mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate untereinander zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tab. A6-A8, Kap. 9.8).

Bei den durch CASA berechneten Motilitätsparametern (STR, LIN, WOB) war im Vergleich mit dem Nativsperma bei den verdünnten Ejakulaten teils eine Zunahme und teils eine Abnahme der Mittelwerte feststellbar. Für alle drei Parameter konnte in den mit CP verdünnten Proben eine Zunahme bzw. Konstanz der durchschnittlichen Werte gesehen werden. In den mit TE verdünnten Proben kam es, verglichen mit den Nativejakulaten, bei den Parametern STR und LIN zu einer Abnahme der Durchschnittswerte und beim Parameter WOB zu einer Zunahme. In den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten kam es beim Parameter STR zu keiner Änderung durch die Zugabe des Verdünners und bei den Parametern LIN und WOB zu einer Abnahme der Mittelwerte gegenüber dem Nativsperma. In den mit Up 1 verdünnten Proben konnte bezüglich der Parameter STR und LIN eine

Abnahme der Mittelwerte gesehen werden und bezüglich des Parameters WOB eine Zunahme.

Die durchschnittlichen mittels CASA berechneten Werte für den Motilitätsparameter LIN (VSL/VCL) der Ejakulate vor und unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) sind in Tab. 16 dargestellt. Beim Vergleich mit dem Nativsperma konnte in den mit CP verdünnten Proben eine Zunahme der Linearität festgestellt werden und in den mit TE, Up 1 + 2 sowie Up 1 verdünnten Proben eine Abnahme. Die stärkste Abnahme der Linearität war in den mit Up 1 verdünnten Proben zu erkennen.

Tab. 16: CASA-Motilitätsparameter LIN (VSL/VCL; n, $\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0

Verdünner	n	$\bar{x} \pm SD$ (%)	Min. (%)	Max. (%)
keiner (Nativsperma)	30	56,6 ± 11,6	27,0	76,0
CP	30	59,3 ± 9,2	39,0	77,0
TE	30	56,2 ± 9,4	37,0	69,0
Up 1 + 2	12	55,0 ± 8,5	42,0	68,0
Up 1	18	53,8 ± 6,4	43,0	65,0

Den Parameter LIN betreffend konnte in den einfaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner“ und den paarweisen Vergleichen nach Student-Newman-Keuls einzig zwischen den mit CP und den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p < 0{,}01$) (Tab. A6-A8, Kap. 9.8).

Insgesamt ließen sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner“ zum Vergleich der Verdünner CP, TE und Up 1 + 2 mit dem Nativsperma (n = 12) unmittelbar nach dem Verdünnen an Tag 0 für die CASA-Motilitätsparameter DAP, DCL, VAP, VCL, VSL und ALH signifikante Unterschiede nachweisen (Tab. A6, Kap. 9.8). In der einfaktoriellen Varianzanalyse zum Vergleich der Verdünner CP, TE und Up 1 mit dem Nativsperma (n = 18) unmittelbar nach dem Verdünnen an Tag 0 konnten für alle CASA-Motilitätsparameter mit Ausnahme von ALH signifikante Unterschiede ermittelt werden (Tab. A7, Kap. 9.8) und auch in der einfaktoriellen Varianzanalyse zum Vergleich der Verdünner CP und TE mit dem Nativsperma (n = 30) unmittelbar nach dem Verdünnen an Tag 0 ließen sich für alle CASA-

Motilitätsparameter mit Ausnahme von STR und LIN signifikante Unterschiede feststellen (Tab. A8, Kap. 9.8).

4.2.3 Einfluss der Verdünner auf die Viabilität an Tag 0

Unmittelbar nach der Aufarbeitung der Nativejakulate mit den verschiedenen Verdünnern konnten weder im Eosinausstrich noch mittels CASA (nach SYBR-14/PI-Färbung) beim Vergleich mit dem Nativsperma signifikante Veränderungen der Viabilität in den verdünnten Ejakulaten beobachtet werden. Auch zwischen den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten untereinander bestanden keine signifikanten Unterschiede.

4.2.3.1 Anteil lebender Samenzellen im Eosinausstrich

Der durchschnittliche Anteil an lebenden Samenzellen im Eosinausstrich in der spermienreichen Fraktion vor und unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) mit den verschiedenen Verdünnern ist in Abb. 10 dargestellt. Nach Zugabe der verschiedenen Verdünner zu den Nativejakulaten blieben die im Eosinausstrich bestimmten prozentualen Anteile an lebenden Spermien beim Vergleich mit dem Nativsperma im Durchschnitt relativ konstant. In den mit CP, TE und Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten war keine deutliche Verringerung des Anteils an lebenden Spermien im Eosinausstrich zu erkennen und in den mit Up 1 verdünnten Proben zeigte sich im Mittel sogar eine Verschiebung des Lebend-Tot-Verhältnisses zugunsten des Anteils an lebenden Samenzellen. Keine der Veränderungen war als signifikant zu bewerten.

Abb. 10: Prozentualer Anteil lebender Samenzellen (Eosinausstrich) im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0; dargestellt als rücktransformierter Mittelwert ($\bar{x}_r$; „modifizierter Mittelwert“) mit negativem und positivem Fehlerbalken („modifizierter 1-s-Bereich“); CP = Verdünner CaniPRO™ Chill 10, TE = TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner, Up 1 + 2 = Uppsala Equex-2 System (Verdünner 1 und Verdünner 2), Up 1 = Uppsala Equex-2 System (nur Verdünner 1), n = Probenanzahl

Unmittelbar nach dem Verdünnen an Tag 0 konnte in der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner“ kein signifikanter Unterschied des durchschnittlichen prozentualen Anteils an lebenden Samenzellen im Eosinausstrich zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE sowie Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelt werden ($n = 12$; $p = 0{,}14$). Auch zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten ($n = 18$; $p = 0{,}19$) und zwischen dem Nativsperma, den mit CP und den mit TE verdünnten Proben ($n = 30$; $p = 0{,}64$) ließ sich bei Betrachtung des prozentualen Anteils an lebenden Spermien im Eosinausstrich kein signifikanter Unterschied nachweisen.

4.2.3.2 Mittels CASA gemessene Viabilität

Die durchschnittliche mittels CASA bestimmte Viabilität nach SYBR-14/PI-Färbung der Nativejakulate und der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) ist in Abb. 11 dargestellt. Nach Aufarbeitung des Nativspermas mit den verschiedenen Verdünnern konnte nur in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten eine Verringerung der CASA-Viabilität im Vergleich mit den Nativejakulaten gesehen werden. Bei den mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten ließ sich im Vergleich mit der durchschnittlichen CASA-

Viabilität der Nativejakulate hingegen sogar eine leichte Zunahme der Mittelwerte unmittelbar nach Verdünnung feststellen. Die beobachteten Veränderungen waren jedoch nicht signifikant.

Abb. 11: Prozentsatz an lebenden Samenzellen (mittels Computer-assisted sperm analysis (CASA; SpermVision™-System) gemessene Viabilität nach SYBR-14/PI-Färbung) im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0; dargestellt als rücktransformierter Mittelwert ($\bar{x}_r$; „modifizierter Mittelwert“) mit negativem und positivem Fehlerbalken („modifizierter 1-s-Bereich“); CP = Verdünner CaniPRO™ Chill 10, TE = TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner, Up 1 + 2 = Uppsala Equex-2 System (Verdünner 1 und Verdünner 2), Up 1 = Uppsala Equex-2 System (nur Verdünner 1), n = Probenanzahl

Unmittelbar nach dem Verdünnen konnte in der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner“ kein signifikanter Unterschied der im Durchschnitt mittels CASA bestimmten Viabilität zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE sowie Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelt werden (n = 12; p = 0,6). Auch zwischen dem Nativsperma, den mit CP und den mit TE verdünnten Ejakulaten konnte bei Betrachtung der CASA-Viabilität kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (n = 30; p = 0,5). Zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten ließ sich hingegen ein signifikanter Unterschied der durchschnittlichen mittels CASA bestimmten Viabilität nachweisen (n = 18; p = 0,021). Im anschließenden Student-Newman-Keuls-Test konnte diese Signifikanz jedoch nicht bestätigt werden. Hier zeigte keines der vergleichend getesteten Paare einen signifikanten Unterschied.

4.2.4 Einfluss der Verdünner auf den Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen an Tag 0

Der durchschnittliche Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen im Eosinausstrich in der spermienreichen Fraktion vor und unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) mit den verschiedenen Verdünnern ist in Tab. 17 dargestellt. Durch die Verdünnung des Nativspermas mit den verschiedenen Verdünnern kam es zu keiner Zunahme des im Mittel bestimmten Anteils an morphologisch veränderten Samenzellen. Im Gegenteil war der im Nativsperma ausgezählte mittlere Anteil höher als in den verdünnten Ejakulaten.

Tab. 17: Prozentualer Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen (Eosinausstrich; n, $\bar{x}_g$, SF, Min., Max.) im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0

Verdünner	n	$\bar{x}_g$ (%)	SF	Min. (%)	Max. (%)
keiner (Nativsperma)	30	10,3	1,66	4,0	37,0
CP	30	7,4	2,21	0,5	30,5
TE	30	8,2	1,93	2,5	35,0
Up 1 + 2	12	7,9	2,08	3,0	26,0
Up 1	18	9,3	1,72	6,0	30,0

Unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) konnte in der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner“ ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Anteils an morphologisch veränderten Samenzellen im Eosinausstrich zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE sowie Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelt werden ($n = 12$; $p = 0{,}041$). Beim anschließenden paarweisen Vergleich mit dem Student-Newman-Keuls-Test stellte sich dieser als signifikanter Unterschied zwischen dem Nativsperma und den mit CP verdünnten Proben heraus ($p < 0{,}05$). Dabei lag der in den mit CP verdünnten Proben bestimmte durchschnittliche Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen unter dem Anteil, der im Nativsperma bestimmt wurde (Tab. 17). Die anderen paarweisen Vergleiche lieferten keine weiteren signifikanten Differenzen.

Getrennt nach den einzelnen auftretenden morphologischen Veränderungen ließen sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE sowie Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten signifikante Unterschiede für den Anteil an Schwanzveränderungen ($n = 12$; $p = 0{,}047$), für den Anteil an

Knickschwänzen ($n = 12$; $p = 0{,}0047$) und für den Prozentsatz an Plasmatropfen ($n = 12$; $p = 0{,}011$) feststellen. Hierbei unterschieden sich im Student-Newman-Keuls-Test bezüglich der Schwanzveränderungen die mit CP verdünnten Ejakulate signifikant vom Nativsperma ($p < 0{,}05$). Bezüglich der Knickschwänze unterschieden sich ebenfalls die mit CP verdünnten Ejakulate signifikant vom Nativsperma ($p < 0{,}05$) und bezüglich der Plasmatropfen unterschieden sich die mit allen drei Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate signifikant vom Nativsperma (CP mit $p < 0{,}05$; TE mit $p < 0{,}05$; Up 1 + 2 mit $p < 0{,}01$), jedoch nicht untereinander. Für alle genannten morphologischen Veränderungen waren die Prozentsätze in den verdünnten Ejakulaten geringer als im Nativsperma.

Zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten konnte mittels einfaktorieller Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied des prozentualen Anteils an morphologisch veränderten Spermien nachgewiesen werden ($n = 18$; $p = 0{,}18$).

Bei Betrachtung der einzelnen auftretenden morphologischen Veränderungen konnten in der einfaktoriellen Varianzanalyse jedoch signifikante Unterschiede zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten bezüglich des Anteils an Knickschwänzen ($n = 18$; $p = 0{,}0001$) und des Anteils an schleifenförmigen Schwänzen ($n = 18$; $p = 0{,}012$) ermittelt werden. Diese erwiesen sich im Student-Newman-Keuls-Test als signifikante Unterschiede zwischen dem Nativsperma und den mit CP, den mit TE sowie den mit Up 1 verdünnten Proben für den Anteil an Knickschwänzen (jeweils mit $p < 0{,}01$) und als signifikante Unterschiede zwischen dem Nativsperma und den mit CP, den mit TE sowie den mit Up 1 verdünnten Proben für den Anteil an schleifenförmigen Schwänzen (jeweils mit $p < 0{,}05$). Dabei war der Prozentsatz an Knickschwänzen in den verdünnten Ejakulaten stets geringer als im Nativsperma, der Anteil an schleifenförmigen Schwänzen jedoch stets höher. Bei keiner der genannten pathologischen Veränderungen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Verdünnern untereinander nachgewiesen werden.

In der einfaktoriellen Varianzanalyse zum Vergleich der mit CP und TE aufgearbeiteten Ejakulate mit dem Nativsperma ließ sich hinsichtlich des Anteils an morphologisch veränderten Samenzellen im Eosinausstrich ein signifikanter Unterschied ermitteln ($n = 30$; $p = 0{,}0022$). Der daraufhin durchgeführte paarweise Vergleich nach Student-Newman-Keuls zeigte signifikante Unterschiede zwischen dem Nativsperma und den mit CP verdünnten Proben ($p < 0{,}01$) und zwischen

dem Nativsperma und den mit TE verdünnten Proben ($p < 0,05$) auf. Die mit CP und die mit TE aufgearbeiteten Ejakulate unterschieden sich bezüglich des Anteils an morphologisch veränderten Samenzellen nicht signifikant voneinander.

Getrennt nach den einzelnen beobachteten morphologischen Veränderungen ließen sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse zwischen dem Nativsperma, den mit CP und den mit TE aufgearbeiteten Proben signifikante Unterschiede für den Anteil an Knickschwänzen ($n = 30$; $p < 0,0001$) und für den Prozentsatz an Plasmatropfen ($n = 30$; $p = 0,0005$) feststellen. Der anschließende paarweise Vergleich nach Student-Newman-Keuls zeigte für beide Parameter signifikante Unterschiede sowohl zwischen dem Nativsperma und den mit CP verdünnten Ejakulaten (jeweils mit $p < 0,01$) als auch zwischen dem Nativsperma und den mit TE verdünnten Ejakulaten (jeweils mit $p < 0,01$). Dabei war die Anteile an Knickschwänzen und Plasmatropfen in den mit CP und TE verdünnten Ejakulaten niedriger als im Nativsperma. Die Verdünner untereinander zeigten keinen signifikanten Unterschied.

4.2.5 Einfluss der Verdünner auf den Anteil an akrosomalen Veränderungen bzw. auf den Anteil an abgelösten Akrosomen an Tag 0

Der durchschnittliche Anteil an akrosomalen Veränderungen (Kopfkappenveränderungen) der Samenzellen bzw. an abgelösten Akrosomen in der Spermac®-Färbung in den Nativejakulaten und in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) ist in Tab. 18 dargestellt. Tendenziell war in mit CP, TE und Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten eine Zunahme des Anteils an Kopfkappenveränderungen der Samenzellen nach der Verdünnung zu erkennen, während in mit Up 1 verdünnten Proben der Anteil an Kopfkappenveränderungen nahezu konstant blieb. Ebenso verhielt es sich für den Anteil an abgelösten Akrosomen. Auch hier konnte in den mit CP, TE und Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten eine tendenzielle Zunahme festgestellt werden, während in mit Up 1 verdünnten Ejakulaten der Anteil an abgelösten Akrosomen konstant blieb. Für beide Untersuchungsparameter wurden die stärksten Zunahmen in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten beobachtet, die geringsten in den mit Up 1 bzw. in den mit TE verdünnten Proben.

Tab. 18: Prozentsatz an Kopfkappenveränderungen bzw. an abgelösten Akrosomen (Werte in Klammern) in der Spermac®-Färbung im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0 (n, $\overline{x}_g$, SF, Min., Max.)

Verdünner	n	$\overline{x}_g$ (%)	SF	Min. (%)	Max. (%)
keiner (Nativsperma)	30 (22)	2,7 (1,4)	2,63 (2,67)	0,0 (0,0)	13,5 (5,0)
CP	30 (22)	4,2 (2,1)	2,43 (2,05)	0,0 (0,0)	25,0 (7,0)
TE	30 (22)	3,9 (1,8)	2,67 (2,28)	0,0 (0,0)	24,5 (8,0)
Up 1 + 2	12 (4)	6,6 (2,7)	2,18 (1,55)	1,5 (1,5)	24,0 (4,0)
Up 1	18 (18)	2,8 (1,4)	2,34 (2,42)	0,0 (0,0)	9,0 (4,0)

Unmittelbar nach dem Verdünnen an Tag 0 konnte in der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner“ kein signifikanter Unterschied des durchschnittlichen prozentualen Anteils an Kopfkappenveränderungen in der Spermac®-Färbung zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE sowie Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelt werden ($n = 12$; $p = 0{,}076$). Auch bei gesonderter Betrachtung der einzelnen auftretenden Kopfkappenveränderungen (abgelöste Kopfkappen, schiefe Kopfkappen, sonstige Veränderungen) konnten durch die einfaktoriellen Varianzanalysen keine signifikanten Unterschiede verifiziert werden.

Zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten war in der einfaktoriellen Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied bezüglich des mittleren Anteils an Kopfkappenveränderungen zu beobachten ($n = 18$; $p = 0{,}14$). Allerdings ließ sich hier bei getrennter Betrachtung der einzelnen Kopfkappenveränderungen in den einfaktoriellen Varianzanalysen ein signifikanter Unterschied bezüglich des Anteils an sonstigen Veränderungen ermitteln ($n = 18$; $p = 0{,}043$). Im anschließenden paarweisen Vergleich nach Student-Newman-Keuls erwies sich dieser ausschließlich als signifikanter Unterschied zwischen dem Nativsperma und den mit Up 1 verdünnten Proben ($p < 0{,}05$), wobei der Anteil an sonstigen Veränderungen in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten höher war als im Nativsperma.

In der einfaktoriellen Varianzanalyse zum Vergleich der mit CP und der mit TE aufgearbeiteten Ejakulate mit dem Nativsperma an Tag 0 ließ sich hinsichtlich des

Anteils an Kopfkappenveränderungen der Samenzellen in der Spermac®-Färbung ein signifikanter Unterschied beobachten ($n = 30$; $p = 0{,}017$). Der im Anschluss durchgeführte Student-Newman-Keuls-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen dem Nativsperma und den mit CP aufgearbeiteten Ejakulaten sowie zwischen dem Nativsperma und den mit TE aufgearbeiteten Ejakulaten (jeweils mit $p < 0{,}05$). Wie aus Tab. 18 ersichtlich, war der Anteil an Kopfkappenveränderungen in den mit CP und TE verdünnten Ejakulaten höher als im Nativsperma. Zwischen den mit CP und den mit TE verdünnten Proben untereinander gab es keinen signifikanten Unterschied. Bei getrennter Betrachtung der einzelnen Kopfkappenveränderungen konnten in den einfaktoriellen Varianzanalysen keine weiteren signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

4.2.6 Einfluss der Verdünner auf den Anteil an membrandefekten Samenzellen im HOS-Test an Tag 0

Der durchschnittliche Anteil an membrandefekten Samenzellen im HOS-Test in der spermienreichen Fraktion der Nativejakulate und der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0) ist in Abb. 12 dargestellt. In allen verdünnten Proben konnte im Vergleich zum Nativsperma ein signifikanter Anstieg des Prozentsatzes an Samenzellen mit nicht aufgerolltem Schwanz („not curled“) beobachtet werden. Dabei zeigte sich der geringste Anstieg in mit Up 1 verdünnten Ejakulaten, der größte in mit Up 1 + 2 verdünnten Proben.

Abb. 12: Prozentsatz an Samenzellen mit nicht aufgerolltem Schwanz („not curled“) im HOS-Test im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0; dargestellt als geometrischer Mittelwert und Streufaktor [$\bar{x}_g$ (SF)]; CP = Verdünner CaniPRO™ Chill 10, TE = TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner, Up 1 + 2 = Uppsala Equex-2 System (Verdünner 1 und Verdünner 2), Up 1 = Uppsala Equex-2 System (nur Verdünner 1), n = Probenanzahl

An Tag 0 konnte in der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner“ ein signifikanter Unterschied des durchschnittlichen Anteils an membrandefekten Samenzellen im HOS-Test zwischen dem Nativsperma, den mit CP, TE sowie Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelt werden ($n = 12$; $p < 0,0001$). Der im Anschluss durchgeführte Student-Newman-Keuls-Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen dem Nativsperma und den mit CP, TE sowie Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten (jeweils mit $p < 0,01$). Beim Vergleich der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate untereinander ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen.

Auch zwischen dem Nativsperma und den mit CP, TE sowie Up 1 verdünnten Proben ließ sich bezüglich des Anteils an membrandefekten Samenzellen im HOS-Test in der einfaktoriellen Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied nachweisen ($n = 18$; $p = 0,027$). Im anschließenden paarweisen Vergleich nach Student-Newman-Keuls ergab sich allerdings lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Nativsperma und den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten ($p < 0,05$).

Weiterhin konnte unmittelbar nach dem Verdünnen in der einfaktoriellen Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied zwischen dem Nativsperma, den mit CP und den mit TE verdünnten Ejakulaten festgestellt werden ($n = 30$; $p = 0,0002$).

Der im Anschluss an die Varianzanalyse durchgeführte paarweise Vergleich nach Student-Newman-Keuls zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen dem Nativsperma und den mit CP verdünnten Proben sowie zwischen dem Nativsperma und den mit TE verdünnen Proben auf (jeweils mit $p < 0,01$).

Zusammenfassend konnte mit dem HOS-Test nachgewiesen werden, dass der Anteil an Samenzellen mit einer defekten Plasmamembran in allen verdünnten Ejakulaten signifikant höher ist verglichen mit den Nativejakulaten. Beim Vergleich der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

4.3 Ergebnisse der Halteproben im Zeitverlauf

In diesem Kapitel erfolgt die Darstellung der Untersuchungsergebnisse nach Flüssigkonservierung über einen Zeitraum von zehn Tagen. Mit Ausnahme des HOS-Testes wurden an den Tagen 1, 2, 3, 5, 7 und 10 die gleichen Spermaparameter untersucht wie an Tag 0 und wie bei der Untersuchung der Nativejakulate. Somit konnten die Einflüsse der verschiedenen Verdünner auf die einzelnen Parameter über den gesamten Untersuchungszeitraum verfolgt werden.

4.3.1 Einfluss der Verdünner auf die Motilität im Zeitverlauf

Die Motilität der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate verminderte sich während der Flüssigkonservierung bei 4°C über zehn Tage, was sowohl mit den Methoden der klassischen Spermatologie als auch mittels CASA verifiziert werden konnte.

Bei Betrachtung der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit, der CASA-Gesamtmotilität und der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit unterschieden sich die mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulate am deutlichsten von den mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten. Im Durchschnitt lagen die Motilitätswerte der mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulate an nahezu jedem Untersuchungstermin merklich niedriger als die Werte der mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate. Dieser Unterschied war bei fast allen genannten Parametern als signifikant zu beurteilen.

4.3.1.1 Subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit

Die durchschnittliche subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate bei Flüssigkonservierung bei 4°C für zehn Tage ist in Abb. 13 und Tab. 19 dargestellt. An Tag 0 unmittelbar nach dem Verdünnen konnte bezüglich der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit kein signifikanter Unterschied zwischen den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten nachgewiesen werden (siehe Kap. 4.2.2.1). Erst im weiteren Zeitverlauf zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Verdünnern, welche insbesondere gegen Ende des Untersuchungszeitraumes deutlich zu erkennen waren. Insgesamt wurde die subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit in den mit CP verdünnten Ejakulaten über den Untersuchungszeitraum hinweg am besten konserviert. In den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten war ab Tag 2 ein drastischer Motilitätsabfall zu beobachten; die durchschnittliche Vorwärtsbeweglichkeit betrug an Tag 2 60,4 ± 28,0 % und an Tag 3 sogar nur noch 47,9 ± 30,0 %, verglichen mit durchschnittlich > 75 % an Tag 2 und > 70 % an Tag 3 in den mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten. Eine ähnliche Abnahme der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit wie in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten konnte in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten ab Tag 5 bzw. ab Tag 7 gesehen werden. Hier betrug die subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit an Tag 5 durchschnittlich 65,3 ± 11,7 % und an Tag 7 durchschnittlich 44,9 ± 17,4 %, während sie im Gegensatz dazu in den mit CP und TE verdünnten Ejakulaten an Tag 5 noch rund 70 % und an Tag 7 noch etwa 60-65 % betrug. An Tag 10 war in den mit CP verdünnten Ejakulaten im Mittel noch eine geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit von 58,2 ± 22,1 % und in den mit TE verdünnten Ejakulaten von 49,3 ± 23,9 % vorhanden.

Abb. 13: Veränderungen der Mittelwerte ± SD des Prozentsatzes an vorwärtsbeweglichen Samenzellen (subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit unter dem Phasenkontrastmikroskop) in den verschiedenen Verdünnern im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung bei 4°C über zehn Tage; CP = Verdünner CaniPRO™ Chill 10, TE = TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner, Up 1 + 2 = Uppsala Equex-2 System (Verdünner 1 und Verdünner 2), Up 1 = Uppsala Equex-2 System (nur Verdünner 1), n = Probenanzahl

In allen verdünnten Ejakulaten kam es im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung zu einer signifikanten Reduktion der durchschnittlichen subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit (jeweils mit $p_{Zeit} < 0,0001$). Die mit CP verdünnten Ejakulate zeigten über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant höhere Werte für die subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit als die mit TE, Up 1 + 2 und Up 1 verdünnten Ejakulate (jeweils mit $p_{Verd} < 0,0001$) und auch der Zeitverlauf der mit CP verdünnten Ejakulate unterschied sich signifikant von den Zeitverläufen der mit TE, Up 1 + 2 und Up 1 verdünnten Ejakulate (jeweils mit $p_W < 0,0001$). In den mit TE aufgearbeiteten Ejakulaten ließen sich bezüglich der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit über den Untersuchungszeitraum wiederum signifikant höhere Werte feststellen als in den mit Up 1 + 2 und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten (jeweils mit $p_{Verd} < 0,0001$) und auch der Zeitverlauf der mit TE aufgearbeiteten Ejakulate unterschied sich signifikant von den Zeitverläufen der mit Up 1 + 2 und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulate (jeweils mit $p_W < 0,0001$).
Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich der Faktoren „Verdünner“ und „Zeit“, in denen jeweils zwei Verdünner bezüglich der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit miteinander verglichen wurden, ist dem Anhang zu entnehmen (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

Tab. 19: Motilitätswerte (subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit, CASA-Gesamtmotilität, CASA-Vorwärtsbeweglichkeit) bei 4°C flüssigkonservierter Hundespermien in den verschiedenen Verdünnern im Zeitverlauf über zehn Tage; angegeben als Veränderungen der Mittelwerte ± SD

Verdünner	n	Tag	subjektiv geschätzte Vorwärts-beweglichkeit (%)	CASA-Gesamtmotilität (%)	CASA-Vorwärts-beweglichkeit (%)
CP	30	0	77,8 ± 11,4	68,3 ± 13,7	59,8 ± 17,1
		1	81,0 ± 12,8	72,5 ± 13,5	64,4 ± 16,3
		2	79,3 ± 12,3	71,5 ± 14,5	63,6 ± 17,0
		3	76,5 ± 13,8	70,4 ± 14,6	61,2 ± 18,2
		5	73,0 ± 17,7	68,9 ± 16,8	59,4 ± 20,2
		7	66,2 ± 18,7	65,3 ± 18,6	56,0 ± 20,5
		10	58,2 ± 22,1	59,1 ± 21,7	48,2 ± 23,3
TE	30	0	77,2 ± 14,3	71,0 ± 13,3	61,1 ± 18,6
		1	80,2 ± 12,1	73,8 ± 13,3	64,0 ± 17,6
		2	76,7 ± 13,2	71,9 ± 14,2	61,6 ± 18,7
		3	74,0 ± 15,9	70,3 ± 15,9	60,1 ± 18,2
		5	69,2 ± 18,4	67,6 ± 17,6	57,4 ± 20,8
		7	60,7 ± 20,3	62,9 ± 19,4	52,1 ± 21,9
		10	49,3 ± 23,9	54,5 ± 22,1	42,7 ± 23,5
Up 1 + 2	12	0	73,8 ± 18,0	63,5 ± 16,5	52,6 ± 20,5
		1	73,3 ± 22,0	62,7 ± 19,4	52,2 ± 23,3
		2	60,4 ± 28,0	52,6 ± 24,4	42,3 ± 25,0
		3	47,9 ± 30,0	46,7 ± 25,8	36,3 ± 27,7
		5	34,5 ± 30,3	38,9 ± 21,6	27,9 ± 21,8
		7	13,5 ± 14,3	22,2 ± 13,9	10,8 ± 12,5
		10	3,5 ± 4,6	12,1 ± 5,6	2,5 ± 4,0
Up 1	18	0	75,8 ± 13,8	75,5 ± 11,8	68,2 ± 13,7
		1	77,8 ± 10,9	79,3 ± 9,5	70,8 ± 12,6
		2	77,5 ± 8,8	74,6 ± 14,6	65,1 ± 18,0
		3	72,2 ± 11,4	69,9 ± 12,2	58,4 ± 16,0
		5	65,3 ± 11,7	62,9 ± 10,0	52,7 ± 11,8
		7	44,9 ± 17,4	49,2 ± 15,5	37,4 ± 16,4
		10	16,2 ± 12,1	24,2 ± 11,5	12,3 ± 10,1

4.3.1.2 Mittels CASA gemessene Gesamtmotilität

Abb. 14 und Tab. 19 zeigen den Prozentsatz an motilen Samenzellen (CASA-Gesamtmotilität) in den verschiedenen Verdünnern bei Flüssigkonservierung bei 4°C für zehn Tage. An Tag 0 unmittelbar nach dem Verdünnen konnte bezüglich der CASA-Gesamtmotilität bereits ein signifikanter Unterschied zwischen den mit CP und den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten festgestellt werden (siehe Kap.

4.2.2.2), wobei der Mittelwert in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten über dem in den mit CP verdünnten Ejakulaten lag. Die mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate unterschieden sich an Tag 0 nicht signifikant voneinander. Wie auch in der graphischen Darstellung (Abb. 14) erkennbar, war die durchschnittliche CASA-Gesamtmotilität in den mit Up 1 verdünnten Proben bis einschließlich Tag 2 höher als die mittlere CASA-Gesamtmotilität in den übrigen Proben. An Tag 3 zeigten die mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulate nahezu gleiche Mittelwerte. Nur in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben ließ sich bereits ab Tag 1 ein starker Abfall der CASA-Gesamtmotilität beobachten, sodass der Mittelwert an Tag 3 bereits deutlich unter dem der mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate lag. Im weiteren Zeitverlauf war auch in den mit Up 1 verdünnten Proben ein deutlicher Motilitätsabfall zu erkennen, welcher zur Folge hatte, dass an Tag 10 nur noch eine CASA-Gesamtmotilität von durchschnittlich 24,2 ± 11,5 % gemessen werden konnte. Im Vergleich dazu war die Abnahme der CASA-Gesamtmotilität in den mit CP und TE verdünnten Proben nur gering. Hier war an Tag 10 noch eine CASA-Gesamtmotilität von 59,1 ± 21,7 % (CP) bzw. 54,5 ± 22,1 % (TE) vorhanden.

Abb. 14: Veränderungen der Mittelwerte ± SD des Prozentsatzes an motilen Samenzellen (mittels Computer-assisted sperm analysis (CASA; SpermVision™-System) gemessene Gesamtmotilität) in den verschiedenen Verdünnern im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung bei 4°C über zehn Tage; CP = Verdünner CaniPRO™ Chill 10, TE = TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner, Up 1 + 2 = Uppsala Equex-2 System (Verdünner 1 und Verdünner 2), Up 1 = Uppsala Equex-2 System (nur Verdünner 1), n = Probenanzahl

In allen verdünnten Ejakulaten kam es im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung zu einer signifikanten Abnahme der durchschnittlichen mittels CASA bestimmten Gesamtmotilität (jeweils mit $p_{Zeit} < 0{,}0001$). Die mit CP verdünnten Ejakulate zeigten über den Untersuchungszeitraum bezüglich der CASA-Gesamtmotilität keinen signifikanten Niveauunterschied zu den mit TE verdünnten Ejakulaten, jedoch zu den mit Up 1 + 2 und Up 1 verdünnten Ejakulaten (jeweils mit $p_{Verd} < 0{,}0001$). Der Zeitverlauf der mit CP verdünnten Ejakulate unterschied sich signifikant von den Zeitverläufen der mit TE, Up 1 + 2 und Up 1 verdünnten Ejakulate (jeweils mit $p_W < 0{,}0001$). Bis einschließlich Tag 2 ließen sich in den mit Up 1 verdünnten Proben höhere Werte ermitteln als in den übrigen Proben. Weiterhin lag die durchschnittliche CASA-Gesamtmotilität in den mit TE verdünnten Proben bis einschließlich Tag 3 über der in den mit CP und Up 1 + 2 verdünnten Proben. Ab Tag 3 konnten dann in den mit CP verdünnten Proben stets höhere Werte bestimmt werden als in den mit TE, Up 1 + 2 und Up 1 verdünnten Proben. Die mit TE aufgearbeiteten Ejakulate wiesen bezüglich der CASA-Gesamtmotilität ebenso einen signifikanten Niveauunterschied zu den mit Up 1 + 2 ($p_{Verd} < 0{,}0001$) und Up 1 ($p_{Verd} = 0{,}0003$) aufgearbeiteten Ejakulaten auf und auch der Zeitverlauf der mit TE aufgearbeiteten Ejakulate unterschied sich signifikant von den Zeitverläufen der mit Up 1 + 2 und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulate (jeweils mit $p_W < 0{,}0001$). Ab Tag 3 waren die Mittelwerte in den mit TE verdünnten Proben stets höher als die in den mit Up 1 + 2 und Up 1 verdünnten Proben.

Eine ausführliche Darstellung der Resultate der zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich der Faktoren „Verdünner“ und „Zeit“, in denen jeweils zwei Verdünner bezüglich der CASA-Gesamtmotilität miteinander verglichen wurden, ist dem Anhang zu entnehmen (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

4.3.1.3 Mittels CASA gemessene Vorwärtsbeweglichkeit

Abb. 15 und Tab. 19 zeigen den Prozentsatz an vorwärtsbeweglichen Samenzellen (CASA-Vorwärtsbeweglichkeit) in den verschiedenen Verdünnern bei Flüssigkonservierung bei 4°C für zehn Tage. Wie bei Betrachtung der CASA-Gesamtmotilität konnte auch bezüglich der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit bereits unmittelbar nach dem Verdünnen ein signifikanter Unterschied zwischen den mit CP und den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten festgestellt werden (siehe Kap. 4.2.2.3). Auch hier lag der in den mit Up 1 verdünnten Proben bestimmte

Mittelwert über dem, der in den mit CP verdünnten Proben bestimmt wurde. Die mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate unterschieden sich an Tag 0 nicht signifikant voneinander. Ebenfalls wie schon bei der CASA-Gesamtmotilität beobachtet, lag die durchschnittliche CASA-Vorwärtsbeweglichkeit in den mit Up 1 verdünnten Proben bis einschließlich Tag 2 über der mittleren CASA-Vorwärtsbeweglichkeit der restlichen Proben. An Tag 3 zeigten die mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulate dann ähnliche Mittelwerte (rund 60 %), während die CASA-Vorwärtsbeweglichkeit in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten an Tag 3 bereits auf 36,3 ± 27,7 % abgesunken war. Ab Tag 5 war auch in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten ein stärkerer Abfall der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit erkennbar als in den mit CP und TE verdünnten Ejakulaten, sodass in den mit Up 1 verdünnten Proben an Tag 10 nur noch eine durchschnittliche CASA-Vorwärtsbeweglichkeit von 12,3 ± 10,1 % vorhanden war, während in den mit CP und TE verdünnten Proben nach zehn Tagen Flüssigkonservierung noch Werte von > 40 % (CP: 48,2 ± 23,3 %; TE: 42,7 ± 23,5 %) beobachtet werden konnten.

Abb. 15: Veränderungen der Mittelwerte ± SD des Prozentsatzes an vorwärtsbeweglichen Samenzellen (mittels Computer-assisted sperm analysis (CASA; SpermVision™-System) gemessene Vorwärtsbeweglichkeit) in den verschiedenen Verdünnern im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung bei 4°C über zehn Tage; CP = Verdünner CaniPRO™ Chill 10, TE = TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner, Up 1 + 2 = Uppsala Equex-2 System (Verdünner 1 und Verdünner 2), Up 1 = Uppsala Equex-2 System (nur Verdünner 1), n = Probenanzahl

Im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung konnte in allen verdünnten Ejakulaten eine signifikante Reduktion der durchschnittlichen mittels CASA bestimmten Vorwärtsbeweglichkeit nachgewiesen werden (jeweils mit $p_{Zeit} < 0{,}0001$). Die mit

CP aufgearbeiteten Ejakulate zeigten über den Untersuchungszeitraum bezüglich der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit einen signifikanten Niveauunterschied zu den mit TE ($p_{Verd} = 0,011$), Up 1 + 2 ($p_{Verd} < 0,0001$) und Up 1 ($p_{Verd} = 0,0001$) aufgearbeiteten Ejakulaten und auch der Zeitverlauf der mit CP aufgearbeiteten Ejakulate unterschied sich signifikant von den Zeitverläufen der mit TE, Up 1 + 2 und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulate (jeweils mit $p_W < 0,0001$). In den mit TE verdünnten Ejakulaten konnte wiederum ein signifikanter Niveauunterschied zu den mit Up 1 + 2 ($p_{Verd} < 0,0001$) und Up 1 ($p_{Verd} = 0,0045$) verdünnten Ejakulaten nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte der Zeitverlauf der mit TE verdünnten Ejakulate einen signifikanten Unterschied zu den Zeitverläufen der mit Up 1 + 2 und Up 1 verdünnten Ejakulate (jeweils mit $p_W < 0,0001$). Insgesamt war die durchschnittliche CASA-Vorwärtsbeweglichkeit in den mit CP und TE aufgearbeiteten Ejakulaten stets signifikant höher als in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten. Im Vergleich mit den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten ließen sich für die durchschnittliche CASA-Vorwärtsbeweglichkeit in den mit CP und TE aufgearbeiteten Ejakulaten anfangs niedrigere, ab Tag 3 jedoch höhere Werte nachweisen. Die mit CP aufgearbeiteten Ejakulate zeigten über den Zeitverlauf im Mittel signifikant höhere Werte für die CASA-Vorwärtsbeweglichkeit als die mit TE aufgearbeiteten Ejakulate.
Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich der Faktoren „Verdünner“ und „Zeit“, in denen jeweils zwei Verdünner bezüglich der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit miteinander verglichen wurden, ist dem Anhang zu entnehmen (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

4.3.1.4 Weitere mittels CASA bestimmte Motilitätsparameter

Die Messergebnisse für weitere durch CASA (SpermVision™-System) bestimmte Motilitätsparameter (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, STR, LIN, WOB) in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten bei Flüssigkonservierung bei 4°C für zehn Tage werden im Anhang tabellarisch dargestellt (Tab. A9, Kap. 9.8). Ebenso lässt sich dort eine ausführliche Darstellung der Resultate der zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich der Faktoren „Verdünner“ und „Zeit“, in denen jeweils zwei Verdünner bezüglich der genannten CASA-Motilitätsparameter miteinander verglichen wurden, finden (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

Bei Betrachtung der Streckenparameter (DAP, DCL, DSL) konnten im Zeitverlauf in allen verdünnten Ejakulaten Abnahmen der Mittelwerte beobachtet werden. Dabei waren die Differenzen zwischen Tag 0 und Tag 10 in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten für alle drei Parameter am größten, gefolgt von den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten. Demgegenüber kam es in den mit CP und TE verdünnten Ejakulaten über den Untersuchungszeitraum hinweg nur zu einer geringen Reduktion der Mittelwerte. Insgesamt lagen die in den mit CP und TE verdünnten Proben gemessenen Werte deutlich über denen in mit Up 1 + 2 und nur mit Up 1 verdünnten Proben. Dabei waren die Mittelwerte in den mit CP verdünnten Ejakulaten für alle drei Parameter über den gesamten Untersuchungszeitraum stets leicht höher als in den mit TE verdünnten Ejakulaten.
Die im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung beobachteten Abnahmen der Mittelwerte für die Parameter DAP, DCL und DSL waren in allen verdünnten Ejakulaten als signifikant zu beurteilen ($p_{Zeit} = 0{,}0021$ bis $< 0{,}0001$). In den mit CP aufgearbeiteten Ejakulaten konnten über den Untersuchungszeitraum bezüglich der Parameter DAP, DCL und DSL signifikante Niveauunterschiede zu den mit TE ($p_{Verd} = 0{,}011$ bis $< 0{,}0001$), Up 1 + 2 (jeweils mit $p_{Verd} < 0{,}0001$) und Up 1 (jeweils mit $p_{Verd} < 0{,}0001$) aufgearbeiteten Ejakulaten nachgewiesen werden. Die Zeitverläufe unterschieden sich zwischen den mit CP und TE aufgearbeiteten Ejakulaten für den Parameter DCL signifikant ($p_W = 0{,}037$), zwischen den mit CP und Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten für alle drei Parameter signifikant (jeweils mit $p_W < 0{,}0001$) und zwischen den mit CP und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten ebenfalls für alle drei Parameter signifikant ($p_W = 0{,}0013$ bis $< 0{,}0001$). Die mit TE verdünnten Ejakulate zeigten bezüglich der drei genannten Parameter signifikante Niveauunterschiede zu den mit Up 1 + 2 (jeweils mit $p_{Verd} < 0{,}0001$) sowie zu den mit Up 1 ($p_{Verd} = 0{,}0004$ bis $< 0{,}0001$) verdünnten Ejakulaten und auch die Zeitverläufe zwischen den mit TE und den mit Up 1 + 2 sowie mit Up 1 verdünnten Ejakulaten unterschieden sich für alle drei Parameter signifikant ($p_W = 0{,}0007$ bis $< 0{,}0001$) (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

Für die Geschwindigkeitsparameter (VAP, VCL, VSL) galt Ähnliches wie für die Streckenparameter. Auch hier waren im Zeitverlauf in allen verdünnten Ejakulaten Abnahmen der durchschnittlichen Messwerte zu beobachten und die Differenzen zwischen Tag 0 und Tag 10 waren für die Parameter VCL und VSL in den mit

Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten am größten, gefolgt von den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten. Lediglich für den Parameter VAP war die Differenz zwischen Tag 0 und Tag 10 in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten am größten, unterschied sich aber nur geringfügig von der in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten. In den mit CP und TE verdünnten Ejakulaten waren die Differenzen und damit die Reduktion der Mittelwerte im Zeitverlauf wesentlich geringer. Auch insgesamt lagen die in den mit CP und TE aufgearbeiteten Ejakulaten gemessenen Werte wieder deutlich über denen in den mit Up 1 + 2 sowie nur mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten. Dabei waren die Mittelwerte für die Parameter VAP und VCL in den mit CP und TE aufgearbeiteten Ejakulaten sogar an Tag 10 noch höher als in die in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten an Tag 0. Für den Parameter VSL galt Letzteres nur in den mit CP aufgearbeiteten Ejakulaten. Generell konnten in den mit CP verdünnten Ejakulaten für alle drei Parameter über den gesamten Untersuchungszeitraum stets geringgradig höhere Mittelwerte beobachtet werden als in den mit TE verdünnten Ejakulaten.

Im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung waren in allen verdünnten Ejakulaten signifikante Abnahmen der Mittelwerte für die Geschwindigkeitsparameter VAP, VCL und VSL nachzuweisen ($p_{Zeit} = 0{,}0012$ bis $< 0{,}0001$). Die mit CP verdünnten Ejakulate zeigten über den Untersuchungszeitraum bezüglich aller Geschwindigkeitsparameter signifikante Niveauunterschiede zu den mit TE ($p_{Verd} = 0{,}033$ bis $< 0{,}0001$), Up 1 + 2 (jeweils mit $p_{Verd} < 0{,}0001$) und Up 1 (jeweils mit $p_{Verd} < 0{,}0001$) verdünnten Ejakulaten. Während sich dabei die Zeitverläufe der mit CP und der mit TE verdünnten Ejakulate für keinen der genannten Parameter signifikant unterschieden, konnten zwischen den Zeitverläufen der mit CP und der mit Up 1 + 2 sowie zwischen den Zeitverläufen der mit CP und der mit Up 1 verdünnten Ejakulate für alle drei Parameter signifikante Unterschiede ermittelt werden ($p_W = 0{,}0019$ bis $< 0{,}0001$). In den mit TE verdünnten Ejakulaten ließen sich bezüglich der Parameter VAP, VCL und VSL signifikante Niveauunterschiede zu den mit Up 1 + 2 (jeweils mit $p_{Verd} < 0{,}0001$) sowie zu den mit Up 1 ($p_{Verd} = 0{,}0002$ bis $< 0{,}0001$) verdünnten Ejakulaten nachweisen und auch die Zeitverläufe zwischen den mit TE und den mit Up 1 + 2 sowie zwischen den mit TE und den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten unterschieden sich für alle drei Parameter signifikant ($p_W = 0{,}0007$ bis $< 0{,}0001$) (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

Bezüglich des Motilitätsparameters ALH konnten im Zeitverlauf in den mit CP, TE und Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten nur geringfügige Veränderungen beobachtet werden. Einzig in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten kam es über den Untersuchungszeitraum zu einer deutlichen Abnahme der Mittelwerte. Insgesamt waren die in den mit CP und TE aufgearbeiteten Ejakulaten gemessenen Werte einander sehr ähnlich und lagen während des gesamten Zeitverlaufs über denen in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten. Die Mittelwerte in den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten entsprachen zu Beginn des Untersuchungszeitraumes bis einschließlich Tag 5 annähernd den Werten in den mit CP und TE aufgearbeiteten Ejakulaten und lagen somit bis dahin auch über denen in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten. Zwischen Tag 7 und Tag 10 kam es dann jedoch zu einer deutlichen Abnahme der Mittelwerte in den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten, sodass die Werte an Tag 10 eher denen in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten entsprachen als denen in den mit CP und TE aufgearbeiteten Ejakulaten.

Obwohl die beobachteten Veränderungen des Parameters ALH z. T. nur geringfügig erschienen, konnten im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung in allen verdünnten Ejakulaten signifikante Abnahmen bezüglich dieses Parameters nachgewiesen werden ($p_{Zeit} = 0{,}0014$ bis $< 0{,}0001$). In den mit CP verdünnten Ejakulaten konnten über den Untersuchungszeitraum für ALH signifikante Niveauunterschiede zu den mit TE ($p_{Verd} = 0{,}0007$) und Up 1 + 2 ($p_{Verd} = 0{,}0001$) aufgearbeiteten Ejakulaten nachgewiesen werden. Die Zeitverläufe unterschieden sich zwischen den mit CP und den mit TE verdünnten Ejakulaten nicht signifikant und auch zwischen den mit CP und den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten konnte für ALH kein signifikanter Unterschied der Zeitverläufe ermittelt werden. Allerdings unterschied sich der Zeitverlauf der mit CP verdünnten Ejakulate signifikant von dem der mit Up 1 verdünnten Ejakulate ($p_W < 0{,}0001$). Die mit TE verdünnten Ejakulate zeigten bezüglich des Parameters ALH signifikante Niveauunterschiede zu den mit Up 1 + 2 ($p_{Verd} = 0{,}0001$) sowie zu den mit Up 1 ($p_{Verd} = 0{,}028$) verdünnten Ejakulaten und auch die Zeitverläufe zwischen den mit TE und den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten unterschieden sich für ALH signifikant ($p_W = 0{,}0006$). Zwischen den Zeitverläufen der mit TE und Up 1 + 2 verdünnten Ejakulate konnte kein signifikanter Unterschied verifiziert werden (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

Bei Betrachtung des Parameters BCF zeigten sich über den Untersuchungszeitraum in allen verdünnten Ejakulaten tendenzielle Abnahmen der Mittelwerte. Dabei war die Differenz zwischen Tag 0 und Tag 10 in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten am größten. Im Gegensatz dazu kam es in den mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten über den Untersuchungszeitraum hinweg nur zu einer geringen Reduktion der Mittelwerte. Insgesamt waren die in den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten gemessenen Werte ab Tag 2 stets höher als die in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten. Die mit CP und TE verdünnten Ejakulate zeigten an Tag 10 leicht höhere Mittelwerte als die mit Up 1 verdünnten Ejakulate.
Die im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung beobachteten Reduktionen der Mittelwerte des Parameters BCF waren in den mit Up 1 + 2 ($p_{Zeit} = 0{,}0003$) und in den mit Up 1 ($p_{Zeit} = 0{,}0092$) verdünnten Ejakulaten als signifikant zu beurteilen. In den mit CP aufgearbeiteten Ejakulaten konnten über den Untersuchungszeitraum für BCF signifikante Niveauunterschiede zu den mit TE ($p_{Verd} = 0{,}0006$) und den mit Up 1 + 2 ($p_{Verd} = 0{,}021$) aufgearbeiteten Ejakulaten nachgewiesen werden. Die Zeitverläufe unterschieden sich zwischen den mit CP und den mit TE sowie zwischen den mit CP und den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten für den Parameter BCF nicht signifikant. Die mit CP aufgearbeiteten Ejakulate unterschieden sich bezüglich BCF nicht signifikant von den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten. Die mit TE verdünnten Ejakulate zeigten bezüglich BCF einen signifikanten Niveauunterschied zu den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten ($p_{Verd} = 0{,}042$) und auch die Zeitverläufe zwischen den mit TE und den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten unterschieden sich signifikant ($p_W = 0{,}012$). Zwischen den mit TE und den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten bestand kein signifikanter Unterschied (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

Bezüglich des Parameters STR konnten im Zeitverlauf in den mit TE, Up 1 + 2 und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten keine wesentlichen Veränderungen beobachtet werden. Lediglich in den mit CP aufgearbeiteten Ejakulaten kam es über den Untersuchungszeitraum zu einer tendenziellen Reduktion der Mittelwerte. Insgesamt lagen die Werte für STR in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten nah beieinander. Der geringste Wert an Tag 10 konnte in den mit CP verdünnten Proben nachgewiesen werden, gefolgt von den mit Up 1

und den mit TE verdünnten Proben. Der höchste Wert an Tag 10 war in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben zu beobachten.
Im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung ließen sich in allen verdünnten Ejakulaten keine signifikanten Veränderungen für STR nachweisen. Die mit CP verdünnten Ejakulate zeigten über den Untersuchungszeitraum für STR einen signifikanten Niveauunterschied zu den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten ($p_{Verd} = 0{,}0097$) und auch die Zeitverläufe der mit CP und der mit Up 1 verdünnten Ejakulate unterschieden sich signifikant voneinander ($p_W = 0{,}012$). Mit Ausnahme von Tag 10 waren in den mit CP verdünnten Proben stets höhere Werte zu beobachten als in den mit Up 1 verdünnten Proben. Zu den mit TE und Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten konnte in den mit CP verdünnten Ejakulaten kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Auch die mit TE verdünnten Ejakulate zeigten bezüglich des Parameters STR einen signifikanten Niveauunterschied zu den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten ($p_{Verd} = 0{,}042$), während sich die Zeitverläufe allerdings nicht signifikant voneinander unterschieden. Hier waren in den mit TE verdünnten Proben zu jedem Untersuchungszeitpunkt höhere Werte nachweisbar als in den mit Up 1 verdünnten Proben. Zu den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten konnte in den mit TE verdünnten Ejakulaten kein signifikanter Unterschied verifiziert werden (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

Für den Parameter LIN konnten im Zeitverlauf in den mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten tendenzielle Abnahmen der durchschnittlichen Werte festgestellt werden, während es in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten im Mittel zu einer tendenziellen Zunahme kam. Die größte Differenz zwischen Tag 0 und Tag 10 konnte in den mit CP verdünnten Proben beobachtet werden, wobei die Werte bis einschließlich Tag 7 in den mit CP verdünnten Proben jedoch trotzdem höher lagen als in den mit TE, Up 1 + 2 und Up 1 verdünnten Proben. Die Mittelwerte in den mit TE aufgearbeiteten Ejakulaten lagen zu fast jedem Untersuchungstermin über denen in den mit Up 1 + 2 und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten. Jedoch zeigte sich an Tag 10 der höchste durchschnittliche Wert für LIN in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten.
Die im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung erkennbaren Abnahmen der Mittelwerte des Parameters LIN waren in den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten als signifikant zu beurteilen ($p_{Zeit} = 0{,}0044$ bis $< 0{,}0001$). In den mit CP verdünnten Ejakulaten konnten über den Untersuchungszeitraum für LIN

signifikante Niveauunterschiede zu den mit TE ($p_{Verd} = 0{,}016$) und den mit Up 1 ($p_{Verd} = 0{,}0015$) verdünnten Ejakulaten nachgewiesen werden. Die Zeitverläufe unterschieden sich bezüglich LIN zwischen den mit CP und den mit TE verdünnten Ejakulaten signifikant ($p_W = 0{,}0012$) und auch zwischen den mit CP und den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten konnte ein signifikanter Unterschied der Zeitverläufe ermittelt werden ($p_W = 0{,}0092$). Die mit TE aufgearbeiteten Ejakulate zeigten bezüglich des Parameters LIN einen signifikanten Niveauunterschied zu den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten ($p_{Verd} = 0{,}016$), wobei sich kein signifikanter Unterschied der Zeitverläufe ermitteln ließ (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

Bei Betrachtung des Parameters WOB war Ähnliches zu beobachten wie beim Parameter LIN. Im Zeitverlauf konnten ebenfalls in den mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten tendenzielle Abnahmen der durchschnittlichen Werte festgestellt werden, während es in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten im Mittel zu einer tendenziellen Zunahme kam. Ebenso konnte wieder in den mit CP verdünnten Ejakulaten die größte Differenz zwischen Tag 0 und Tag 10 festgestellt werden, wobei die Mittelwerte bis einschließlich Tag 7 in den mit CP verdünnten Ejakulaten jedoch trotzdem höher lagen als in den mit TE, Up 1 + 2 und Up 1 verdünnten Ejakulaten. Die durchschnittlichen Werte in den mit TE verdünnten Ejakulaten lagen bis einschließlich Tag 3 über denen in den mit Up 1 + 2 und Up 1 verdünnten Ejakulaten, an den Tagen 5 und 7 nur über denen in mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten und an Tag 10 nur über dem in mit Up 1 verdünnten Ejakulaten. Der höchste durchschnittliche Wert für WOB an Tag 10 konnte ebenfalls wieder in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten beobachtet werden.
Im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung waren in den mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten signifikante Abnahmen der Mittelwerte des Parameters WOB nachweisbar (jeweils mit $p_{Zeit} < 0{,}0001$). Die mit CP verdünnten Ejakulate zeigten im Zeitverlauf bezüglich WOB einen signifikanten Niveauunterschied zu den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten ($p_{Verd} = 0{,}0005$). Die Zeitverläufe ließen zwischen den mit CP und den mit TE ($p_W = 0{,}0035$) sowie zwischen den mit CP und den mit Up 1 + 2 ($p_W = 0{,}0099$) verdünnten Ejakulaten signifikante Unterschiede erkennen. Die mit TE aufgearbeiteten Ejakulate zeigten für WOB einen signifikanten Niveauunterschied zu den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten

(p_{Verd} = 0,0078), wobei kein signifikanter Unterschied der Zeitverläufe ermittelt werden konnte (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

4.3.2 Einfluss der Verdünner auf die Viabilität im Zeitverlauf

Die Viabilität der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate verminderte sich während der Flüssigkonservierung bei 4°C über zehn Tage. Dies konnte sowohl mit den Methoden der klassischen Spermatologie (Eosinausstrich) als auch mittels CASA (nach SYBR-14/PI-Färbung) nachgewiesen werden, wobei im Durchschnitt jedoch die mittels CASA gemessenen Werte, insbesondere gegen Ende des Untersuchungszeitraumes, deutlich niedriger waren als die durch Auszählung des Eosinausstrichs ermittelten Werte. Für den Anteil an lebenden Samenzellen im Eosinausstrich wie auch für die CASA-Viabilität nach SYBR-14/PI-Färbung galt tendenziell, dass in den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten über den gesamten Zeitverlauf die höchsten Mittelwerte beobachtet werden konnten und die mit CP und TE aufgearbeiteten Ejakulate einen einander ähnlichen Verlauf aufwiesen, wobei die Mittelwerte leicht unter denen in den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten lagen. Die Mittelwerte in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten waren über den gesamten Untersuchungszeitraum deutlich niedriger.

4.3.2.1 Anteil lebender Samenzellen im Eosinausstrich

Abb. 16 zeigt den prozentualen Anteil lebender Samenzellen im Eosinausstrich in den verschiedenen Verdünnern bei Flüssigkonservierung bei 4°C für zehn Tage. Während an Tag 0 unmittelbar nach dem Verdünnen bezüglich des Anteils an lebenden Samenzellen kein signifikanter Unterschied zwischen den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten festgestellt werden konnte (siehe Kap. 4.2.3.1), zeigten sich im weiteren Zeitverlauf dagegen deutliche Niveauunterschiede zwischen den verdünnten Ejakulaten. Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg lag der Anteil lebender Samenzellen in den mit Up 1 aufgearbeiteten Proben über dem in mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Proben und betrug an Tag 10 noch durchschnittlich 84,6 %. In den mit CP und TE verdünnten Ejakulaten konnte ein annähernd identischer Verlauf des Anteils lebender Samenzellen über die Zeit hinweg beobachtet werden. Hier lag der Anteil an Tag 10 im Mittel noch bei 80,0 % (CP) bzw. 79,6 % (TE). Der Anteil an lebenden Samenzellen in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten lag ab

Tag 1 zu jedem Untersuchungszeitpunkt unter dem Anteil in den mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten und betrug an Tag 10 durchschnittlich nur noch 71,5 %.

Abb. 16: Veränderungen des prozentualen Anteils lebender Samenzellen (Eosinausstrich) in den verschiedenen Verdünnern im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung bei 4°C über zehn Tage; dargestellt als rücktransformierter Mittelwert ($\bar{x}_r$; „modifizierter Mittelwert“) mit negativem und positivem Fehlerbalken („modifizierter 1-s-Bereich“); CP = Verdünner CaniPRO™ Chill 10, TE = TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner, Up 1 + 2 = Uppsala Equex-2 System (Verdünner 1 und Verdünner 2), Up 1 = Uppsala Equex-2 System (nur Verdünner 1), n = Probenanzahl

In allen verdünnten Ejakulaten kam es im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung zu einer signifikanten Abnahme des Anteils lebender Samenzellen im Eosinausstrich (jeweils mit $p_{Zeit} < 0{,}0001$). Die mit CP verdünnten Ejakulate zeigten über den Untersuchungszeitraum bezüglich des Anteils lebender Samenzellen keinen signifikanten Niveauunterschied zu den mit TE oder Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten und auch der Zeitverlauf der mit CP verdünnten Ejakulate unterschied sich nicht signifikant von dem der mit den übrigen Verdünnern verdünnten Ejakulate. Lediglich zwischen den mit CP und den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten konnte bezüglich des Anteils an lebenden Samenzellen ein signifikanter Niveauunterschied ermittelt werden ($p_{Verd} = 0{,}019$), wobei die durchschnittlichen Werte in den mit CP verdünnten Proben stets niedriger waren als in den mit Up 1 verdünnten Proben. Auch für die mit TE aufgearbeiteten Ejakulate ließ sich kein signifikanter Niveauunterschied zu den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten nachweisen, wobei sich jedoch die Zeitverläufe der beiden Verdünner signifikant unterschieden ($p_W = 0{,}045$). Dabei war die Abnahme des Anteils lebender

Samenzellen in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben zwischen Tag 0 und Tag 1 stärker ausgeprägt als in den mit TE verdünnten Proben. Zwischen den mit TE und den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten konnte ein signifikanter Niveauunterschied ermittelt werden ($p_{Verd} = 0{,}033$), wobei die durchschnittlichen Werte auch hier in den mit TE aufgearbeiteten Ejakulaten stets niedriger waren als in den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten. Die Zeitverläufe zwischen den mit TE und den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten unterschieden sich nicht signifikant (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

4.3.2.2 Mittels CASA gemessene Viabilität

Die durchschnittliche mittels CASA bestimmte Viabilität nach SYBR-14/PI-Färbung in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten bei Flüssigkonservierung bei 4°C für zehn Tage ist in Abb. 17 dargestellt. Während an Tag 0, wie bereits auch schon für den Anteil an lebenden Samenzellen im Eosinausstrich beobachtet, bezüglich der CASA-Viabilität noch kein signifikanter Unterschied zwischen den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten festgestellt werden konnte (siehe Kap. 4.2.3.2), waren im weiteren Zeitverlauf deutliche Unterschiede zwischen den verdünnten Ejakulaten zu erkennen. Zwar zeigten die mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulate von Tag 0 bis einschließlich Tag 3 einen ähnlichen Verlauf der durchschnittlichen CASA-Viabilität, während die mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulate bereits zu Beginn und auch bis Ende des Untersuchungszeitraumes deutlich niedrigere Werte erkennen ließen. Im weiteren Zeitverlauf lagen die Mittelwerte in den mit Up 1 aufgearbeiteten Proben dann jedoch stets über denen, die in den mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Proben bestimmt wurden, während die mit CP und TE verdünnten Ejakulate weiterhin einen ähnlichen Verlauf zeigten. An Tag 10 konnte in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten nur noch eine durchschnittliche CASA-Viabilität von 37,7 % bestimmt werden, während in den mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten die mittlere CASA-Viabilität noch rund 60 % (CP: 58,8 %; TE: 59,7 %) bzw. fast 70 % (Up 1: 68,0 %) betrug.

Abb. 17: Veränderungen des Prozentsatzes an lebenden Samenzellen (mittels Computer-assisted sperm analysis (CASA; SpermVision™-System) gemessene Viabilität nach SYBR-14/PI-Färbung) in den verschiedenen Verdünnern im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung bei 4°C über zehn Tage; dargestellt als rücktransformierter Mittelwert ($\bar{x}_r$; „modifizierter Mittelwert“) mit negativem und positivem Fehlerbalken („modifizierter 1-s-Bereich“); CP = Verdünner CaniPRO™ Chill 10, TE = TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner, Up 1 + 2 = Uppsala Equex-2 System (Verdünner 1 und Verdünner 2), Up 1 = Uppsala Equex-2 System (nur Verdünner 1), n = Probenanzahl

Im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung kam es in allen verdünnten Ejakulaten zu einer signifikanten Reduktion der mittels CASA gemessenen Viabilität (jeweils mit $p_{Zeit} < 0{,}0001$). In den mit CP aufgearbeiteten Ejakulaten konnte über den Untersuchungszeitraum bezüglich der CASA-Viabilität kein signifikanter Niveauunterschied zu den mit TE aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelt werden und auch die Zeitverläufe zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Verdünnern CP und TE. Hingegen konnte ein signifikanter Niveauunterschied zwischen den mit CP und den mit Up 1 + 2 ($p_{Verd} < 0{,}0001$) sowie zwischen den mit CP und den mit Up 1 ($p_{Verd} = 0{,}019$) aufgearbeiteten Ejakulaten nachgewiesen werden. Auch die Zeitverläufe unterschieden sich signifikant zwischen den mit CP und den mit Up 1 + 2 ($p_W = 0{,}019$) sowie zwischen den mit CP und den mit Up 1 ($p_W = 0{,}042$) aufgearbeiteten Ejakulaten. Dabei konnten in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben über den gesamten Untersuchungszeitraum durchschnittlich niedrigere Werte für die CASA-Viabilität und in den mit Up 1 verdünnten Proben ab Tag 5 durchschnittlich höhere Werte als in den mit CP verdünnten Proben beobachtet werden. In den mit TE verdünnten Ejakulaten konnte ein signifikanter Niveauunterschied zu den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten ermittelt werden ($p_{Verd} = 0{,}0001$); die Zeitverläufe zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied.

Dabei waren die Mittelwerte in den mit TE verdünnten Proben stets höher als in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben. Zwischen den mit TE und den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten konnte weder ein signifikanter Niveauunterschied noch ein signifikanter Unterschied im Zeitverlauf nachgewiesen werden (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

4.3.3 Einfluss der Verdünner auf den Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen im Zeitverlauf

Abb. 18 zeigt den mittleren prozentualen Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen im Eosinausstrich in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten bei Flüssigkonservierung bei 4°C für zehn Tage. Es ist ersichtlich, dass sich die Verläufe der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate zu Beginn des Untersuchungszeitraumes bis Tag 3 stärker unterschieden als über den restlichen Untersuchungszeitraum. Ab Tag 3 zeigten die mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulate sehr ähnliche Verläufe, während sich im Vergleich dazu in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten im Mittel stets leicht niedrigere Anteile an morphologisch veränderten Samenzellen feststellen ließen. Insgesamt stieg der Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen während der Flüssigkonservierung bei 4°C über zehn Tage in allen verdünnten Ejakulaten leicht an. Der geringste Anstieg war dabei in den mit Up 1 aufgearbeiteten Proben zu erkennen, wobei hier allerdings der Ausgangswert an Tag 0 unmittelbar nach dem Verdünnen höher lag als in den mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Proben. Schließlich konnte an Tag 10 in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten der geringste Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen beobachtet werden (9,8 %), während dieser in den mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten 10,7 % (CP, TE) bzw. 10,6 % (Up 1) betrug.

Anteil morphologisch veränderter Samenzellen (Eosinausstrich) in %
24,0
22,0
20,0
18,0
16,0
14,0
12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Tage
CP (n = 30)
TE (n = 30)
Up 1 + 2 (n = 12)
Up 1 (n = 18)

Abb. 18: Veränderungen des prozentualen an Anteils morphologisch veränderten Samenzellen (Eosinausstrich) in den verschiedenen Verdünnern im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung bei 4°C über zehn Tage; dargestellt als geometrischer Mittelwert und Streufaktor [$\bar{x}_g$ (SF)]; CP = Verdünner CaniPRO™ Chill 10, TE = TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner, Up 1 + 2 = Uppsala Equex-2 System (Verdünner 1 und Verdünner 2), Up 1 = Uppsala Equex-2 System (nur Verdünner 1), n = Probenanzahl

Im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung kam es in fast allen verdünnten Ejakulaten zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an morphologisch veränderten Samenzellen im Eosinausstrich ($p_{Zeit} = 0{,}0007$ bis $< 0{,}0001$). Die mit CP verdünnten Ejakulate zeigten über den Untersuchungszeitraum bezüglich des Anteils an morphologisch veränderten Samenzellen einen signifikanten Niveauunterschied zu den mit TE verdünnten Ejakulaten ($p_{Verd} = 0{,}015$), jedoch unterschieden sich die Zeitverläufe nicht signifikant voneinander. Bis einschließlich Tag 3 war der Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen in den mit CP verdünnten Proben niedriger als in den mit TE verdünnten Proben. Von Tag 5 bis Tag 10 unterschieden sich die Anteile morphologisch veränderter Samenzellen in den mit CP und TE verdünnten Proben dann kaum noch. Zwischen den mit CP und den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten ließ sich kein signifikanter Niveauunterschied ermitteln. Allerdings unterschieden sich die Zeitverläufe zwischen den Verdünnern CP und Up 1 + 2 signifikant ($p_W = 0{,}032$). Dabei war der Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben bis einschließlich Tag 2 höher als in den mit CP verdünnten Proben. An den Tagen 3 und 5 kam es dann in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben zu einer Verringerung des durchschnittlichen Anteils an morphologisch veränderten Samenzellen, während dieser in den mit CP verdünnten Proben jedoch weiter anstieg. An den Tagen 7 und 10 war der Anteil an morphologisch veränderten

Samenzellen schließlich in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben niedriger als in den mit CP verdünnten Proben. Zwischen den mit CP und Up 1 verdünnten Ejakulaten konnte über den Untersuchungszeitraum kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Auch zwischen den mit TE und Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten sowie zwischen den mit TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten ließen sich keine signifikanten Unterschiede verifizieren.

Bei getrennter Betrachtung der einzelnen morphologischen Veränderungen fiel auf, dass für die Anteile an Kopf- und Halsveränderungen weder signifikante Zunahmen im Zeitverlauf noch signifikante Unterschiede zwischen den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten nachgewiesen werden konnten.
Hingegen zeigte der Anteil an Schwanzveränderungen im Zeitverlauf in fast allen verdünnten Ejakulaten einen signifikanten Anstieg ($p_{Zeit} = 0{,}0082$ bis $< 0{,}0001$). Zudem konnte bezüglich dieses Anteils ein signifikanter Niveauunterschied zwischen den mit CP und den mit TE verdünnten Ejakulaten ermittelt werden ($p_{Verd} = 0{,}012$); die Zeitverläufe ließen keinen signifikanten Unterschied erkennen. In den mit TE verdünnten Proben konnte bis einschließlich Tag 7 stets ein höherer Anteil an Schwanzveränderungen beobachtet werden als in den mit CP verdünnten Proben. An Tag 10 war jedoch der mittlere Anteil an Schwanzveränderungen in den mit CP verdünnten Proben (7,5 %, SF = 2,24) höher als in den mit TE verdünnten Proben (7,1 %, SF = 2,65). Auch zwischen den mit CP und den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten konnte bezüglich des Anteils an Schwanzveränderungen ein signifikanter Niveauunterschied ermittelt werden ($p_{Verd} = 0{,}032$) und ebenso ein signifikanter Unterschied der Zeitverläufe ($p_W = 0{,}0034$). Hier war der Anteil an Schwanzveränderungen über den Untersuchungszeitraum in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben im Mittel geringer als in den mit CP verdünnten Proben und betrug an Tag 10 durchschnittlich 6, 1 % (SF = 2,76). Weiterhin konnte auch zwischen den mit TE und den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten ein signifikanter Niveauunterschied ($p_{Verd} = 0{,}0028$) sowie ein signifikanter Unterschied der Zeitverläufe ($p_W = 0{,}028$) nachgewiesen werden, wobei der Anteil an Schwanzveränderungen über den Untersuchungszeitraum wieder in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben durchschnittlich geringer war als in den mit TE verdünnten Proben. Zwischen den mit CP und Up 1 sowie zwischen

den mit TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten bestanden hinsichtlich des Anteils an Schwanzveränderungen keine signifikanten Unterschiede.

Innerhalb der Schwanzveränderungen konnten über den Untersuchungszeitraum in allen verdünnten Ejakulaten signifikante Zunahmen des Anteils an schleifenförmigen Schwänzen beobachtet werden ($p_{Zeit} = 0,0003$ bis $< 0,0001$), während die Anteile an aufgerollten Schwänzen und an Knickschwänzen nur teilweise signifikant zunahmen. Bezüglich des Anteils an schleifenförmigen Schwänzen konnten zwischen den mit CP und TE ($p_{Verd} = 0,014$), zwischen den mit CP und Up 1+ 2 ($p_{Verd} = 0,0103$), zwischen den mit TE und Up 1 + 2 ($p_{Verd} = 0,0022$) sowie zwischen den mit TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten ($p_{Verd} = 0,045$) signifikante Niveauunterschiede nachgewiesen werden; die Zeitverläufe unterschieden sich jedoch nicht signifikant. Dabei war der durchschnittliche Anteil an schleifenförmigen Schwänzen im Zeitverlauf in den mit CP verdünnten Proben geringer als in den mit TE verdünnten Proben, aber höher als in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben. Auch in den mit TE verdünnten Proben war der mittlere Prozentsatz an schleifenförmigen Schwänzen im Zeitverlauf höher als in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben und lag ebenso über dem in den mit Up 1 verdünnten Proben.

Bei Betrachtung des Anteils an losen Köpfen konnten in den mit TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten signifikante Abnahmen im Zeitverlauf nachgewiesen werden ($p_{Zeit} = 0,0004$). Zwischen den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten untereinander bestanden bezüglich des Anteils an losen Köpfen keine signifikanten Unterschiede.

Der Prozentsatz an Plasmatropfen zeigte über den Untersuchungszeitraum in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten eine signifikante Zunahme ($p_{Zeit} = 0,013$). Zudem bestand ein signifikanter Niveauunterschied zwischen den mit CP und den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten ($p_{Verd} = 0,032$), wobei die Zeitverläufe sich allerdings nicht signifikant unterschieden. Dabei war der durchschnittliche Prozentsatz an Plasmatropfen in den mit CP verdünnten Proben niedriger als in den mit Up 1 verdünnten Proben.

Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich der Faktoren „Verdünner“ und „Zeit“, in denen jeweils zwei Verdünner bezüglich des Anteils an morphologisch veränderten Samenzellen im Eosinausstrich bzw. bezüglich der einzelnen morphologischen

Veränderungen miteinander verglichen wurden, ist im Anhang zu finden (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

4.3.4 Einfluss der Verdünner auf den Anteil an akrosomalen Veränderungen im Zeitverlauf

Der im Durchschnitt mittels Spermac®-Färbung ermittelte Anteil an Samenzellen mit akrosomalen Veränderungen (Kopfkappenveränderungen) in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten bei Flüssigkonservierung bei 4°C für zehn Tage ist in Abb. 19 dargestellt. Tendenziell war in den mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten im Zeitverlauf ein Anstieg des mittleren Anteils an Samenzellen mit Kopfkappenveränderungen zu erkennen, während diese Tendenz in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten nicht zu beobachten war. Die Verläufe der mit CP und TE verdünnten Ejakulate unterschieden sich dabei kaum und an Tag 10 konnte ein durchschnittlicher Anteil an Kopfkappenveränderungen von 7,6 % (CP) bzw. 8,5 % (TE) ermittelt werden. Im Gegensatz dazu konnten zwischen den mit Up 1 +2 und den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten gerade zu Beginn des Untersuchungszeitraumes deutliche Unterschiede gesehen werden. Der Durchschnitt an Samenzellen mit veränderter Kopfkappe war dabei an Tag 0 in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten wesentlich geringer (2,8 %) verglichen mit dem in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten (6,6 %) und lag auch unter den in den mit CP (4,2 %) und TE (3,9 %) verdünnten Ejakulaten ermittelten Werten. Ab Tag 3 lag der mittlere Anteil an Kopfkappenveränderungen in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten stets unter dem Anteil in den mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten und betrug an Tag 10 durchschnittlich 4,0 %.

Abb. 19: Veränderungen des prozentualen Anteils an Samenzellen mit Kopfkappenveränderungen (Spermac®-Färbung) in den verschiedenen Verdünnern im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung bei 4°C über zehn Tage; dargestellt als geometrischer Mittelwert und Streufaktor [$\bar{x}_g$ (SF)]; CP = Verdünner CaniPRO™ Chill 10, TE = TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner, Up 1 + 2 = Uppsala Equex-2 System (Verdünner 1 und Verdünner 2), Up 1 = Uppsala Equex-2 System (nur Verdünner 1), n = Probenanzahl

In den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten kam es im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an Samenzellen mit Kopfkappenveränderungen ($p_{Zeit} = 0{,}0006$ bis $< 0{,}0001$). In den mit CP aufgearbeiteten Ejakulaten konnten über den Untersuchungszeitraum bezüglich des Anteils an Samenzellen mit Kopfkappenveränderungen keine signifikanten Unterschiede zu den mit TE und Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelt werden. Hingegen ließ sich zwischen den mit CP und den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten ein signifikanter Niveauunterschied nachweisen ($p_{Verd} = 0{,}021$), auch wenn die Zeitverläufe keinen signifikanten Unterschied zeigten. Dabei konnten in den mit CP verdünnten Proben bis einschließlich Tag 3 höhere durchschnittliche Anteile an Samenzellen mit Kopfkappenveränderungen beobachtet werden als in den mit Up 1 verdünnten Proben. Ab Tag 5 waren dann die durchschnittlichen Anteile in den mit CP verdünnten Proben stets niedriger als in den mit Up 1 verdünnten Proben. Zwischen den mit TE und Up 1 + 2 sowie zwischen den mit TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten konnten bezüglich des Anteils an Kopfkappenveränderungen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Bei gesonderter Betrachtung der einzelnen auftretenden Kopfkappenveränderungen (abgelöste Kopfkappen, schiefe Kopfkappen, sonstige

Veränderungen) konnten für den Anteil an abgelösten Kopfkappen über den Untersuchungszeitraum in den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten signifikante Zunahmen nachgewiesen werden ($p_{Zeit} = 0{,}0018$ bis $< 0{,}0001$). Zudem unterschieden sich die Zeitverläufe zwischen den mit CP und den mit TE verdünnten Ejakulaten ($p_W = 0{,}0068$) sowie zwischen den mit CP und den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten ($p_W = 0{,}038$) bezüglich des Anteils an abgelösten Kopfkappen signifikant. Dabei war der Anteil an abgelösten Akrosomen in den mit CP verdünnten Proben ab Tag 2 stets niedriger als der in den mit TE verdünnten Proben und betrug an Tag 10 durchschnittlich 3,1 % (SF = 2,73) gegenüber 5,4 % (SF = 1,94) in den mit TE verdünnten Proben. Bis einschließlich Tag 3 war der Anteil an abgelösten Kopfkappen in den mit Up 1 verdünnten Proben niedriger als in den mit CP verdünnten Proben, ab Tag 5 dann jedoch stets höher, sodass an Tag 10 ein mittlerer Anteil von 3,7 % (SF = 1,81) beobachtet werden konnte. Der Anteil an abgelösten Akrosomen in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten veränderte sich im Zeitverlauf nur geringfügig und betrug an Tag 10 durchschnittlich 3,0 % (SF = 3,55).
Für den Anteil an schiefen Kopfkappen waren im Zeitverlauf in den mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten ebenfalls signifikante Zunahmen zu beobachten ($p_{Zeit} = 0{,}012$ bis $< 0{,}0001$). Die mit CP verdünnten Ejakulate zeigten bezüglich dieses Anteils einen signifikanten Niveauunterschied zu den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten ($p_{Verd} = 0{,}043$), wobei die durchschnittlichen Werte in den mit CP verdünnten Proben im Mittel höher waren als in den mit Up 1 verdünnten Proben, auch wenn die Werte an Tag 10 sich nicht voneinander unterschieden (CP: 1,3 %, SF = 2,78; Up 1: 1,3 %, SF = 2,14).
Auch für den Anteil an sonstigen Kopfkappenveränderungen konnten in den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten im Zeitverlauf signifikante Zunahmen ermittelt werden (jeweils mit $p_{Zeit} < 0{,}0001$). In den mit CP verdünnten Ejakulaten konnte bezüglich des Anteils an sonstigen Kopfkappenveränderungen ein signifikanter Niveauunterschied zu den mit TE ($p_{Verd} = 0{,}031$) sowie zu den mit Up 1 ($p_{Verd} = 0{,}0025$) verdünnten Ejakulaten nachgewiesen werden und auch die Zeitverläufe der mit CP und der mit Up 1 verdünnten Ejakulate unterschieden sich signifikant ($p_W = 0{,}03$). Dabei war den Anteil an sonstigen akrosomalen Veränderungen in den mit CP aufgearbeiteten Proben im Zeitverlauf durchschnittlich höher als in den mit TE aufgearbeiteten Proben und niedriger als in den mit Up 1 aufgearbeiteten Proben. In den mit CP verdünnten Ejakulaten

konnte an Tag 10 ein durchschnittlicher Anteil von 1,3 % (SF = 5,03), in den mit TE verdünnten Ejakulaten von 1,1 % (SF = 4,19) und in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten von 2,2 % (SF = 3,08) bestimmt werden. In den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten veränderte sich der Anteil an sonstigen Kopfkappenveränderungen über den Untersuchungszeitraum kaum und betrug an Tag 10 im Durchschnitt 0,2 % (SF = 1,0).

Eine ausführliche Darstellung der Resultate der zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich der Faktoren „Verdünner“ und „Zeit“, in denen jeweils zwei Verdünner bezüglich des Anteils an Samenzellen mit Kopfkappenveränderungen bzw. bezüglich der einzelnen Kopfkappenveränderungen miteinander verglichen wurden, ist dem Anhang zu entnehmen (Tab. A10-A14, Kap. 9.8).

4.4 Korrelationen der untersuchten Parameter

In diesem Kapitel werden zum einen die Zusammenhänge zwischen den subjektiv bestimmten und den objektiv mittels CASA (SpermVision™-System) gemessenen Werten und zum anderen die Zusammenhänge zwischen verschiedenen ausgewählten Spermaparametern dargestellt. Dabei wurden zunächst Korrelationsanalysen nach Nativsperma und nach den einzelnen Verdünnern getrennt durchgeführt, bei denen aber alle Untersuchungstermine gemeinsam betrachtet wurden und des Weiteren Korrelationsanalysen, bei denen die Nativejakulate und alle Verdünner sowie alle Untersuchungszeitpunkte einbezogen wurden (explorativ).

4.4.1 Zusammenhang zwischen den mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten und den durch CASA gemessenen Dichten

4.4.1.1 Korrelationen nach Verdünnern getrennt

Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen den mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten und den durch CASA gemessenen Dichten sind in Tab. 20 dargestellt.

Tab. 20: Korrelationen zwischen den mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten und den durch CASA (SpermVision™-System) gemessenen Dichten in den Nativejakulaten und in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten; n = Anzahl der getesteten (zeitgleichen) Variablenpaare, r = Korrelationskoeffizient nach Pearson, p = p-Wert

Verdünner	n	r	p
keiner (Nativsperma)	30	0,539	0,002
CP	30	0,880	< 0,001
TE	30	0,861	< 0,001
Up 1 + 2	12	0,798	0,002
Up 1	18	0,943	< 0,001

Sowohl in den Nativejakulaten als auch in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten konnten statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen den mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten und den durch CASA gemessenen Dichten ermittelt werden.

4.4.1.2 Korrelation ohne Trennung nach Verdünnern

Der Zusammenhang zwischen den mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten und den durch CASA ermittelten Dichten wird durch die nachfolgende Punktwolke (Abb. 20) veranschaulicht.

Regressionsgerade: y = 0,40013x + 0,15647

CASA-Dichte nach Wurzeltransformation

mittels Neubauer-Zählkammer bestimmte Dichte nach Wurzeltransformation

Abb. 20: Korrelation zwischen den mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten und den durch Computer-assisted sperm analysis (CASA; SpermVision™-System) gemessenen Dichten in den Nativejakulaten und in allen verdünnten Ejakulaten; n (zeitgleiche Variablenpaare) = 120

Die Korrelationsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,708$ bei einer Signifikanz von $p < 0,001$. Die Korrelation zwischen den mit den verschiedenen Methoden bestimmten Werten war somit als statistisch signifikant zu beurteilen. Im Durchschnitt waren die mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten Dichten jedoch höher als die durch CASA gemessenen Dichten.

4.4.2 Zusammenhang zwischen der subjektiv geschätzten und der mittels CASA gemessenen Vorwärtsbeweglichkeit

Die Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen wurde in den einzelnen (verdünnten) Ejakulaten zu jedem Untersuchungstermin unter dem Phasenkontrastmikroskop subjektiv geschätzt und daneben mittels CASA gemessen.

4.4.2.1 Korrelationen nach Verdünnern getrennt

Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der subjektiv geschätzten und der mittels CASA bestimmten Vorwärtsbeweglichkeit sind in Tab. 21 dargestellt.

Tab. 21: Korrelationen zwischen subjektiv geschätzter und mittels CASA (SpermVision™-System) gemessener Vorwärtsbeweglichkeit in den Nativejakulaten und in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten; n = Anzahl der getesteten (zeitgleichen) Variablenpaare, r = Korrelationskoeffizient nach Pearson, p = p-Wert

Verdünner	n	r	p
keiner (Nativsperma)	30	0,564	0,001
CP	210	0,862	< 0,001
TE	210	0,860	< 0,001
Up 1 + 2	84	0,946	< 0,001
Up 1	126	0,871	< 0,001

Es ließen sich sowohl in den Nativejakulaten als auch in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen der subjektiv geschätzten und der mittels CASA bestimmten Vorwärtsbeweglichkeit nachweisen.

4.4.2.2 Korrelation ohne Trennung nach Verdünnern

Der Zusammenhang zwischen der subjektiv geschätzten und der mittels CASA bestimmten Vorwärtsbeweglichkeit wird durch die nachfolgenden Punktwolke (Abb. 21) dargestellt.

Abb. 21: Korrelation zwischen der geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit unter dem Phasenkontrastmikroskop und der mittels Computer-assisted sperm analysis (CASA; SpermVision™-System) gemessenen Vorwärtsbeweglichkeit in den Nativejakulaten und in allen verdünnten Ejakulaten zu allen Untersuchungszeitpunkten; n (zeitgleiche Variablenpaare) = 660

Die Korrelationsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0{,}885$ bei einer Signifikanz von $p < 0{,}001$. Somit konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit und der mittels CASA gemessenen Vorwärtsbeweglichkeit nachgewiesen werden, wobei die subjektiv geschätzten Mittelwerte durchschnittlich jedoch $12{,}5 \pm 11{,}5$ % über den mittels CASA bestimmten Werten lagen.

4.4.3 Zusammenhang zwischen dem im Eosinausstrich bestimmten Anteil an lebenden Spermien und der durch CASA ermittelten Viabilität

Der Anteil lebender Spermien wurde in den einzelnen (verdünnten) Ejakulaten zu jedem Untersuchungstermin durch Auszählung von 200 Spermien im Eosinausstrich bestimmt. Daneben wurde nach SYBR-14/PI-Färbung die Viabilität durch CASA ermittelt.

4.4.3.1 Korrelationen nach Verdünnern getrennt

Tab. 22 gibt die Resultate der Korrelationsanalysen zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen dem im Eosinausstrich bestimmten Anteil lebender Spermien und der durch CASA ermittelten Viabilität nach SYBR-14/PI-Färbung wieder.

Tab. 22: Korrelationen zwischen dem im Eosinausstrich bestimmten Anteil lebender Spermien und der mittels CASA (SpermVision™-System) ermittelten Viabilität nach SYBR-14/PI-Färbung in den Nativejakulaten und in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten; n = Anzahl der getesteten (zeitgleichen) Variablenpaare, r = Korrelationskoeffizient nach Pearson, p = p-Wert

Verdünner	n	r	p
keiner (Nativsperma)	30	0,476	0,008
CP	210	0,778	< 0,001
TE	210	0,740	< 0,001
Up 1 + 2	84	0,778	< 0,001
Up 1	126	0,612	< 0,001

In den Nativejakulaten und in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten konnten statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen dem im Eosinausstrich bestimmten Anteil lebender Spermien und der durch CASA ermittelten Viabilität nach SYBR-14/PI-Färbung nachgewiesen werden.

4.4.3.2 Korrelation ohne Trennung nach Verdünnern

Der Zusammenhang zwischen dem im Eosinausstrich bestimmten Anteil lebender Spermien und der durch CASA ermittelten Viabilität nach SYBR-14/PI-Färbung wird durch die nachfolgenden Punktwolke (Abb. 22) veranschaulicht.

Abb. 22: Korrelation zwischen dem im Eosinausstrich bestimmten Anteil lebender Spermien und der durch Computer-assisted sperm analysis (CASA; SpermVision™-System) ermittelten Viabilität nach SYBR-14/PI-Färbung in den Nativejakulaten und in allen verdünnten Ejakulaten zu allen Untersuchungszeitpunkten; n (zeitgleiche Variablenpaare) = 660

Die Korrelationsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0{,}743$ bei einer Signifikanz von $p < 0{,}001$. Die Korrelation zwischen den mit den verschiedenen Methoden bestimmten Werten war somit als statistisch signifikant zu beurteilen. Der mittels Eosinausstrich bestimmte Anteil lebender Samenzellen war im Mittel 12,5 ± 10,8 % höher als die durch CASA gemessene Viabilität.

4.4.4 Zusammenhänge zwischen verschiedenen Spermaparametern

4.4.4.1 Korrelationen nach Verdünnern getrennt

Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen verschiedenen ausgewählten Untersuchungsparametern sind in Tab. 23 dargestellt.

Tab. 23: Korrelationen zwischen verschiedenen Untersuchungsparametern in den Nativejakulaten und in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten; n = Anzahl der getesteten (zeitgleichen) Variablenpaare, r = Korrelationskoeffizient nach Pearson, p = p-Wert

Parameter	Verdünner	n	r	p
subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit *versus* Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen (nach logarithmischer Transformation)	keiner (Nativsperma)	30	- 0,499	0,005
	CP	210	- 0,717	< 0,001
	TE	210	- 0,643	< 0,001
	Up 1 + 2	84	- 0,488	< 0,001
	Up 1	126	- 0,390	< 0,001
CASA-Vorwärtsbeweglichkeit *versus* Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen (nach logarithmischer Transformation)	keiner (Nativsperma)	30	- 0,487	0,006
	CP	210	- 0,708	< 0,001
	TE	210	- 0,672	< 0,001
	Up 1 + 2	84	- 0,547	< 0,001
	Up 1	126	- 0,366	< 0,001
Anteil lebender Samenzellen im Eosinausstrich (nach Arcus-Sinus-Transformation) *versus* Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen (nach logarithmischer Transformation)	keiner (Nativsperma)	30	- 0,430	0,018
	CP	210	- 0,696	< 0,001
	TE	210	- 0,697	< 0,001
	Up 1 + 2	84	- 0,824	< 0,001
	Up 1	126	- 0,653	< 0,001
CASA-Viabilität (nach Arcus-Sinus-Transformation) *versus* Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen (nach logarithmischer Transformation)	keiner (Nativsperma)	30	- 0,449	0,013
	CP	210	- 0,653	< 0,001
	TE	210	- 0,582	< 0,001
	Up 1 + 2	84	- 0,532	< 0,001
	Up 1	126	- 0,567	< 0,001
subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit *versus* Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test (nach logarithmischer Transformation)	keiner (Nativsperma)	30	- 0,518	0,003
	CP	30	- 0,380	0,038
	TE	30	- 0,509	0,004
	Up 1 + 2	12	- 0,847	< 0,001
	Up 1	18	- 0,560	0,016
CASA-Gesamtmotilität *versus* Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test (nach logarithmischer Transformation)	keiner (Nativsperma)	30	- 0,464	0,010
	CP	30	- 0,401	0,028
	TE	30	- 0,521	0,003
	Up 1 + 2	12	- 0,881	< 0,001
	Up 1	18	- 0,674	0,002
CASA-Vorwärtsbeweglichkeit *versus* Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test (nach logarithmischer Transformation)	keiner (Nativsperma)	30	- 0,508	0,004
	CP	30	- 0,400	0,029
	TE	30	- 0,513	0,004
	Up 1 + 2	12	- 0,875	< 0,001
	Up 1	18	- 0,668	0,002

Anteil lebender Samenzellen im Eosinausstrich (nach Arcus-Sinus-Transformation) *versus* Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test (nach logarithmischer Transformation)	keiner (Nativsperma)	30	- 0,385	0,036
	CP	30	- 0,613	< 0,001
	TE	30	- 0,582	< 0,001
	Up 1 + 2	12	- 0,786	0,002
	Up 1	18	- 0,513	0,030
CASA-Viabilität (nach Arcus-Sinus-Transformation) *versus* Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test (nach logarithmischer Transformation)	keiner (Nativsperma)	30	- 0,756	< 0,001
	CP	30	- 0,733	< 0,001
	TE	30	- 0,781	< 0,001
	Up 1 + 2	12	- 0,795	0,002
	Up 1	18	- 0,624	0,006
Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen (nach logarithmischer Transformation) *versus* Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test (nach logarithmischer Transformation)	keiner (Nativsperma)	30	0,331	0,074
	CP	30	0,495	0,005
	TE	30	0,668	< 0,001
	Up 1 + 2	12	0,673	0,016
	Up 1	18	0,808	< 0,001

Mit Ausnahme der Kombination Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen *versus* Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test, bei welcher sich für die Nativejakulate keine statistisch signifikante Korrelation nachweisen ließ, zeigten alle getesteten Parameterkombinationen einen signifikanten Zusammenhang. Die höchsten Korrelationen konnten dabei zwischen der CASA-Viabilität und dem Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test beobachtet werden (siehe Tab. 23); diese Parameter waren negativ miteinander korreliert.

4.4.4.2 Korrelation ohne Trennung nach Verdünnern

Tab. 24 zeigt die Resultate der Korrelationsanalysen zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen verschiedenen ausgewählten Untersuchungsparametern, in die sowohl die Nativejakulate als auch alle verdünnten Ejakulate zu allen Untersuchungsterminen einbezogen wurden.

Tab. 24: Korrelationen zwischen verschiedenen Untersuchungsparametern in den Nativejakulaten und in allen verdünnten Ejakulaten zu allen Untersuchungszeitpunkten; n = Anzahl der getesteten (zeitgleichen) Variablenpaare, r = Korrelationskoeffizient nach Pearson, p = p-Wert

Parameter	n	r	p
subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit *versus* Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen (nach logarithmischer Transformation)	660	- 0,501	< 0,001
CASA-Vorwärtsbeweglichkeit *versus* Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen (nach logarithmischer Transformation)	660	- 0,538	< 0,001
Anteil lebender Samenzellen im Eosinausstrich (nach Arcus-Sinus-Transformation) *versus* Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen (nach logarithmischer Transformation)	660	- 0,672	< 0,001
CASA-Viabilität (nach Arcus-Sinus-Transformation) *versus* Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen (nach logarithmischer Transformation)	660	- 0,535	< 0,001
subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit *versus* Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test (nach logarithmischer Transformation)	120	- 0,525	< 0,001
CASA-Gesamtmotilität *versus* Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test (nach logarithmischer Transformation)	120	- 0,523	< 0,001
CASA-Vorwärtsbeweglichkeit *versus* Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test (nach logarithmischer Transformation)	120	- 0,552	< 0,001
Anteil lebender Samenzellen im Eosinausstrich (nach Arcus-Sinus-Transformation) *versus* Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test (nach logarithmischer Transformation)	120	- 0,522	< 0,001
CASA-Viabilität (nach Arcus-Sinus-Transformation) *versus* Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test (nach logarithmischer Transformation)	120	- 0,724	< 0,001
Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen (nach logarithmischer Transformation) *versus* Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test (nach logarithmischer Transformation)	120	0,446	< 0,001

Für alle getesteten Parameterkombinationen konnten statistisch signifikante Zusammenhänge nachgewiesen werden. Die engste (negative) Korrelation bestand auch hier wieder zwischen der CASA-Viabilität und dem Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Splitsample-Verfahren drei verschiedene Verdünner für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma bei 4°C vergleichend untersucht. Hierbei handelte es sich um den kommerziellen Verdünner CaniPRO™ Chill 10 (Minitüb GmbH, Tiefenbach; CP), einen selbst hergestellten TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner (TE) und den zweiphasigen Uppsala Equex-2 System-Verdünner, der ebenfalls selbst hergestellt wurde. Bei Letzterem ließen sich zwei Versuchsteile unterscheiden (siehe Kap. 3.4.2). In Versuchsteil I erfolgte die Verdünnung mit dem kompletten Uppsala Equex-2 System, d. h. mit den Verdünnern 1 und 2 (Up 1 + 2), und in Versuchsteil II nur mit Verdünner 1 (Up 1). Ziel der Untersuchungen war es, die Auswirkungen der verschiedenen Verdünner auf die Spermaqualität während der Flüssigkonservierung bei 4°C für zehn Tage zu testen und so die Eignung der verschiedenen Verdünner zu überprüfen. Die Beurteilung der Spermaqualität erfolgte mithilfe klassischer und moderner spermatologischer Untersuchungsmethoden. Daher konnte zusätzlich geprüft werden, inwieweit beide Untersuchungsverfahren gleichwertige Ergebnisse liefern.

5.1 Diskussion der Fragestellung

Die KB mit flüssigkonserviertem Sperma ist in der Hundezucht weitverbreitet (Kmenta et al., 2011) und gerade in den letzten Jahren deutlich angestiegen (Concannon und Battista, 1989; Pinto et al., 1999; Peña et al., 2006). Ein Grund für das gesteigerte Interesse an der Flüssigkonservierung sind die besseren Konzeptionsraten bei KB mit flüssigkonserviertem Sperma im Vergleich zur KB mit kryokonserviertem Sperma (Concannon und Battista, 1989). Zudem ist die Herstellung von flüssigkonserviertem Sperma, verglichen mit der von TG-Sperma, einfacher und kostengünstiger (Linde-Forsberg, 1991; 2001; Peña et al., 2006).
Die Literaturrecherche hat gezeigt, dass bereits viele verschiedene Verdünner für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma getestet wurden (Concannon und Battista, 1989; Linde-Forsberg, 1991; Peña et al., 2006). Dabei sind die am häufigsten verwendeten Medien milch- oder eigelbbasierte Verdünner mit unterschiedlichen Variationen (Pinto et al., 1999). In vergleichenden Studien wurden verschiedene nichtkommerzielle (selbst im Labor hergestellte) und z. T.

auch kommerzielle Verdünner hinsichtlich ihrer Eignung für die Flüssigkonservierung von Hundesperma untersucht (Bartlett, 1962a; Foote und Leonard, 1964; Province et al., 1984; Bouchard et al., 1990; Rota et al., 1995; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Tsutsui et al., 2003b; Hermansson und Linde-Forsberg, 2006; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007; Beccaglia et al., 2009a; Kmenta et al., 2011). In vielen der genannten Publikationen fanden TRIS-gepufferte Eigelb-Verdünner Verwendung, was auf die Bedeutung dieser Verdünner hinweist. Tatsächlich ist einer der derzeit gebräuchlichsten Verdünner ein TRIS-gepufferter Eigelb-Verdünner mit 20 % Eigelb und entweder Glukose- oder Fruktosezusatz (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Hermansson und Linde-Forsberg, 2006; Günzel-Apel, 2007; Pesch et al., 2007). Neuere Arbeiten beschäftigen sich hingegen mit TRIS-Lecithin-Verdünnern (Beccaglia et al., 2009a; Kmenta et al., 2011), da es Bestrebungen gibt, Eigelb als Verdünnerbestandteil zu ersetzen, weil es sich bei letzterem um ein biologisch riskantes Produkt tierischen Ursprungs handelt, dem ein potentielles Risiko mikrobieller Kontamination innewohnt (Hoffmann, 2003d; Bergeron und Manjunath, 2006; Beccaglia et al., 2009b; Farstad, 2009) und weil dessen Zusammensetzung extrem variabel ist (Bergeron und Manjunath, 2006; Beccaglia et al., 2009a).

Hauptgründe für die Auswahl des kommerziellen Verdünners CP waren seine schnelle Verfügbarkeit und die einfache Handhabung. Der Verdünner TE wurde aufgrund seines weitverbreiteten Einsatzes bei der Flüssigkonservierung von caninem Sperma - auch in der KGGA - ausgewählt. Der Uppsala Equex-2 System-Verdünner, bei welchem es sich eigentlich um einen zweiphasigen Verdünner für die Kryokonservierung von Hundesperma handelt, wurde mit in diese Arbeit aufgenommen, da er nach der Kryokonservierung gute Auftauergebnisse liefert (Martins-Bessa et al., 2006), und getestet werden sollte, ob dies auch für die Messergebnisse nach Flüssigkonservierung zutrifft. Zur Verwendung dieses Verdünners für die Kryokonservierung von caninem Sperma liegen in der Literatur zahlreiche Arbeiten vor (z. B. Hermansson und Linde-Forsberg, 2006; Martins-Bessa et al., 2006; Schäfer-Somi et al., 2006) und auch in der KGGA wird er zur Kryokonservierung von Hundesperma eingesetzt. Bezüglich des Einsatzes des Uppsala Equex-2 System-Verdünners zur Flüssigkonservierung gibt es nur wenige Publikationen (Hermansson und Linde-Forsberg, 2006; Hermansson et al., 2006).

Bisher lässt sich in der Literatur keine Untersuchung finden, welche die drei genannten Verdünner miteinander vergleicht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die drei Verdünner hinsichtlich ihrer Eignung zur Flüssigkonservierung von caninem Sperma bei 4°C vergleichend zu überprüfen und so den am besten geeigneten Verdünner für die Flüssigkonservierung von Hundesperma im klinischen Alltag auszuwählen, um diese Informationslücke zu füllen.
Die verschiedenen Spermaparameter, welche als Beurteilungsgrundlage dienten, wurden z. T. sowohl mit den Methoden der klassischen Spermatologie als auch mittels CASA (System SpermVision™ der Minitüb GmbH, Tiefenbach) untersucht. In der Literatur werden hohe Korrelationen zwischen der subjektiv geschätzten Motilität und der mittels CASA bestimmten Motilität (Günzel-Apel et al., 1993; Rijsselaere et al., 2002b; 2003; Schäfer-Somi und Aurich, 2007) sowie zwischen der subjektiv bestimmten Konzentration und der mittels CASA gemessenen Spermienkonzentration (Günzel-Apel et al., 1993; Rijsselaere et al., 2003) beschrieben. Deshalb bestand ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit darin, zu überprüfen, ob sich mit beiden Untersuchungsmethoden gleichwertige Ergebnisse erzielen lassen und somit die in der Literatur gefundenen Aussagen bestätigt werden können.

5.2 Diskussion der Methodik

5.2.1 Auswahl der Probanden

Das für die Untersuchungen genutzte Sperma wurde von einem heterogenen Probandenkollektiv aus 30 Rüden gewonnen, um eine für den klinischen Alltag repräsentative Stichprobe und zudem unabhängige Proben zu erhalten. Die Möglichkeit individueller Effekte wurde dabei zugunsten der Unabhängigkeit der Proben in Kauf genommen. Von der ausschließlichen Nutzung der klinikseigenen Rüden wurde abgesehen, da Ergebnisse erzielt werden sollten, die auf die Situation in der klinischen Praxis übertragen werden können.
Die Rüden unterschieden sich hinsichtlich der Rassen, des Alters und der bisherigen Zuchtnutzung. Alle Faktoren zusammen sollten gewährleisten, dass das Probandenkollektiv die Situation im klinischen Alltag widerspiegelt. Des Weiteren wurden die insgesamt 16 verschiedenen Rassen gewählt, um eine Rassediversität sicherzustellen und damit einen wie von England (1999)

beschriebenen Einfluss der Rasse auf die Spermaqualität auszuschließen. Die Bevorzugung von Rüden mittlerer bis großer Hunderassen geschah vor dem Hintergrund, dass die Untersuchungen mittels Splitsample-Verfahren durchgeführt wurden, weshalb möglichst volumenreiche Ejakulate benötigt wurden und Volumen und SGZ der spermienreichen Fraktion von der Körpergröße des Rüden abhängig sind (Günzel, 1986). Dabei ist die SGZ positiv korreliert mit der Körpergröße des Hundes und der daraus resultierenden Größe der Hoden (Olar et al., 1983; Günzel, 1986; Johnston, 1991; Freshman, 2002). Bezüglich des Alters wurde darauf geachtet, keine Rüden, die jünger als ein Jahr waren, zur Spermagewinnung heranzuziehen, da aufgrund von Untersuchungen an Beagle-Rüden erst ab circa diesem Zeitpunkt von einem vollständigen Erreichen der Geschlechtsreife auszugehen ist (Christiansen, 1984b). Etwa die Hälfte der Rüden (16 von 30) wurde vorher bereits zur Zucht eingesetzt. Jedoch wurde der Zuchterfolg nicht weiter erfragt, da dies für die Untersuchungen nicht relevant erschien. Die Rüden sollten bewusst nicht nach ihrer Spermaqualität ausgewählt werden, was zu einer individuellen Variation der Spermaparameter führte, wie es auch im klinischen Alltag der Fall ist. Da die vorliegende Arbeit primär die Haltbarkeit des flüssigkonservierten Spermas betrachtete, war es zu vertreten, auch Sperma zu verwenden, das den Mindestanforderungen nicht entsprach. Allerdings wurde darauf geachtet, dass die letzte Zuchtnutzung (natürlicher Deckakt oder manuelle Spermagewinnung) länger als mindestens zwei Tage zurücklag, da bei einer höheren Absamungsfrequenz durch eine Erschöpfung der epididymalen Spermareserven die SGZ im Ejakulat vermindert sein kann (Boucher et al., 1958; England, 1999).

Die spermienreiche Fraktion eines Rüden (Nr. 20) wies eine Beimengung in Form von Blut auf. Das betreffende Ejakulat wurde trotzdem für die Versuche verwendet, da die Blutbeimengung als gering einzustufen war und des Weiteren geprüft werden sollte, ob die in der Literatur gefundenen Aussagen bezüglich Blutbeimengungen bei Flüssigkonservierung bestätigt werden können. Nach Seager und Fletcher (1972) kann Blut ein Medium für bakterielles Wachstum bieten und so die Spermaqualität nachteilig beeinflussen. Diese nachteiligen Effekte treten allerdings erst nach längerer Inkubationsdauer auf (England und Allen, 1992). Rijsselaere et al. (2004b) konnten keine negativen Effekte von Blutbeimengungen (Zusatz von ≤ 10 Vol. % venösem Vollblut) auf die funktionellen Merkmale von für vier Tage flüssigkonserviertem Sperma nachweisen, wohl aber

eine signifikante Qualitätsreduktion nach Kryokonservierung und Auftauen bei Blutbeimengungen ≥ 2 Vol. % venösem Vollblut. Als Ursache hierfür ist die nach Kryokonservierung im Vergleich zur Flüssigkonservierung wesentlich stärkere Hämolyse anzusehen und insbesondere das freigesetzte Hämoglobin (Rijsselaere et al., 2004b).

Bei Hund Nr. 24 fiel während der speziellen andrologischen Untersuchung eine derb-knotige Konsistenz des rechten Hodens auf, bei welcher es sich um einen Hodentumor handelte. Die bei der Spermauntersuchung erfassten Parameter lagen mit Ausnahme der SGZ des Ejakulates im Normbereich. Die verminderte Gesamtzahl der Spermien im Ejakulat (Oligozoospermie) stand vermutlich in Zusammenhang mit dem am Hoden erhobenen Befund. Da jedoch alle anderen untersuchten Parameter der Norm entsprachen, wurde das Ejakulat in der vorliegenden Studie verwendet. Zudem handelte es sich hierbei um einen Fall, der durchaus auch in der Praxis auftreten kann und, wie zu Beginn dieses Abschnittes erwähnt, sollte in der vorliegenden Arbeit die Situation im klinischen Alltag widergespiegelt werden.

5.2.2 Spermagewinnung

Die Methodik der Spermagewinnung durch manuelle Stimulation entspricht der üblichen Verfahrensweise beim Hund (Günzel, 1986; Linde-Forsberg, 1991; Freshman, 2002; Hoffmann, 2003a; Kutzler, 2005). Bei Rüden kleiner Rassen kann die Spermagewinnung auf einem Tisch erfolgen (Freshman, 2002), bei großen Rüden wird sie vorzugsweise auf dem Fußboden durchgeführt (Linde-Forsberg, 1991). Letzteres war aufgrund der ausschließlichen Verwendung mittlerer und großer Hunderassen bei der vorliegenden Untersuchung die übliche Vorgehensweise. Die Anwesenheit einer läufigen bzw. einer mit synthetischem Pheromon präparierten Hündin zur sexuellen Stimulation, welche nach Günzel (1986) die Erfolgschancen verbessert und gleichzeitig zu einer Steigerung der Spermaqualität führt (Seager und Platz, 1977b; Peña et al., 2006), war in der vorliegenden Studie mit einer Ausnahme (Hund Nr. 3) durch die klinikseigenen Hündinnen immer gewährleistet. Dies kann in der Praxis z. T. jedoch nicht immer sichergestellt werden. Allerdings ist eine Spermagewinnung auch ohne die Anwesenheit einer Hündin möglich (Günzel, 1986), was durch Hund Nr. 3 bestätigt werden konnte. Da es sich bei diesem Hund jedoch um einen erfahrenen Zuchtrüden handelte, bleibt offen, inwieweit die Spermagewinnung bei einem

unerfahrenen Rüden ohne die Anwesenheit einer Hündin erfolgreich durchgeführt werden kann.

5.2.3 Verwendete spermatologische Untersuchungsmethoden

Die Ejakulate wurden sowohl nach den Methoden der klassischen Spermatologie als auch mittels CASA (System SpermVision™ der Minitüb GmbH, Tiefenbach) untersucht.

5.2.3.1 Klassische Spermatologie

Die Methodik der einzelnen Untersuchungen stimmte mit den in der Literatur für die Standardspermatologie beschriebenen Untersuchungsmethoden überein (Günzel, 1986; Johnston, 1991; Freshman, 2002; Hoffmann, 2003b).

Die Beurteilung der Motilität in den Nativejakulaten erfolgte, wie von Johnston (1991) und Freshman (2002) empfohlen, sofort im Anschluss an die Spermagewinnung, um einer zeitverzögerungsbedingten Abnahme der Motilität und damit einer Verfälschung der Ausgangswerte vorzubeugen. Das flüssigkonservierte Sperma wurde, wie von Linde-Forsberg (1991) empfohlen, vor der Untersuchung immer auf 37°C angewärmt. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die Körpertemperatur der Hündin und somit auch die Temperatur im Uterus etwa 38°C beträgt (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a) und zudem bekannt ist, dass Untersuchungen bei 30°C signifikant niedrigere Motilitätswerte ergeben als Untersuchungen bei 38°C (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a). Die Motilitätsbeurteilung in den Nativejakulaten sowie in den flüssigkonservierten Ejakulaten unmittelbar nach deren Herstellung wurde stets von zwei Personen durchgeführt, wobei es sich bei einer Person um einen erfahrenen Untersucher handelte. Dieses Vorgehen sollte die Subjektivität der Motilitätsschätzung reduzieren.

Der Anteil an lebenden Samenzellen wurde nach Supravitalfärbung mit Eosin als alleinigem Farbstoff beurteilt (Riesenbeck et al., 2001; Hoffmann, 2003b). Ebenso wurden die morphologischen Veränderungen der Samenzellen nach Färbung mit Eosin bestimmt (Hoffmann, 2003b). Diese Färbung wurde gewählt, da sie eine ausreichend gute Differenzierung der morphologischen Veränderungen gestattet und einfach sowie schnell durchzuführen ist und daher auch in der Routinepraxis gut eingesetzt werden kann. Nachteilig an der Eosinfärbung ist, dass die in der Färbelösung enthaltenen Salze in den getrockneten Ausstrichen zu

Kristallbildungen neigen, welche die Samenzellen verdecken und so deren Beurteilung verhindern (Peña Martínez, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnten Kristallbildungen in den Ausstrichen jedoch nur gelegentlich und auch nur in geringem Ausmaß beobachtet werden, sodass eine Beurteilung der Samenzellen immer möglich war.

Zur Beurteilung der akrosomalen Integrität wurde die Spermac®-Färbung eingesetzt, welche sich beim Rüden für diesen Zweck bereits bewährt hat (Riesenbeck et al., 2001). Ebenso erwies sich die Spermac®-Färbung für die Erfassung von Veränderungen am Akrosom, welche während des Verarbeitungsprozesses bei der Konservierung von caninem Sperma auftreten können, als vorteilhaft (Oettlé, 1986). Bei dieser Färbung handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Färbeset zur selektiven Anfärbung der Bestandteile einer Samenzelle einschließlich des Akrosoms. Durch die selektive Anfärbung des Akrosoms konnten Veränderungen an letzterem gezielt beurteilt werden, was im Eosinausstrich nicht möglich gewesen wäre. Daher stellte die Spermac®-Färbung eine geeignete Ergänzung zur Färbung mit Eosin dar. Nachteilig war allerdings, dass die Beurteilung der mit Spermac® gefärbten Ausstriche bei den flüssigkonservierten Ejakulaten teilweise durch störende Überlagerungen mit grün gefärbten Partikeln erschwert wurde. Vermutlich handelte es sich hierbei um angefärbte Eigelbpartikel aus den verschiedenen Verdünnern, obwohl nach Oettlé (1986) der Verdünner die Farbaffinität der Spermac®-Färbung nicht zu beeinflussen scheint. Zudem war die Auszählung der mit Spermac® gefärbten Ausstriche bei stark verdünnten Ejakulaten sehr zeitaufwendig.

Zusätzlich wurde der HOS-Test durchgeführt, um die funktionale Integrität der Spermienplasmamembran zu untersuchen. Zwar untersucht auch die Supravitalfärbung (Lebend-Tot-Färbung) die Membranintegrität, jedoch werden durch Supravitalfärbung und HOS-Test verschiedene Aspekte des Verhaltens der Spermienmembran erfasst. Erstere misst, ob die Membran physikalisch geschädigt ist, was ein Zeichen für Zelltod darstellt. Durch letzteren wird bestimmt, ob eine intakte Membran biochemisch aktiv ist. Verschiedene Vorgänge während der Befruchtung, wie z. B. Kapazitation, AR und Gamentenfusion, setzen eine aktive Spermienmembran voraus, sodass die Befruchtung nicht stattfinden kann, wenn die Membran zwar physikalisch intakt, aber biochemisch inaktiv ist. Deshalb liefert der HOS-Test aussagekräftigere Ergebnisse als die Supravitalfärbung (Correa und Zavos, 1994; Kumi-Diaka und Badtram, 1994). Weiterhin ist der HOS-

Test simpel, ökonomisch, klinisch leicht anwendbar und schnell durchzuführen, weshalb er eine nützliche Ergänzung zur Standardspermauntersuchung darstellt (Jeyendran et al., 1992; Pinto und Kozink, 2008) und daher auch in der vorliegenden Studie eingesetzt wurde.
Die klassische Spermatologie gestattet eine relativ schnelle Beurteilung der Spermaqualität und ist für den Praxisalltag gut geeignet, da sie mit einfacher Laborausstattung durchgeführt werden kann. Allerdings ist die konventionelle mikroskopische Untersuchung, insbesondere bei der Beurteilung der Motilität und der Pathomorphologie, sehr subjektiv (Amann, 1989) und wird stark von der Erfahrung des Untersuchers beeinflusst (Verstegen et al., 2002). Um diese Subjektivität zumindest bei einzelnen Parametern (Motilität und Viabilität) zu umgehen, wurden die Ejakulate in der vorliegenden Studie zusätzlich mittels CASA untersucht. Dies ist in der Routinepraxis aufgrund der hohen Anschaffungskosten für CASA-Systeme jedoch nicht möglich.

5.2.3.2 Computer-assisted sperm analysis (CASA)

Für die CASA-Untersuchungen kam das System SpermVision™ zum Einsatz, welches die Beurteilung einer großen Anzahl an Samenzellen in relativ kurzer Zeit ermöglichte. Nach Rijsselaere et al. (2003) sind insbesondere die technischen Einstellungen wichtig, um die Bewegungsbahnen der einzelnen Spermien zu identifizieren und zu rekonstruieren. Sie beeinflussen die Datenausgabe von CASA-Systemen in kritischer Weise (Ellington et al., 1993; Smith und England, 2001; Amann und Katz, 2004). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die vom Hersteller empfohlenen Analyseeinstellungen für das SpermVision™-System gewählt und nicht weiter modifiziert. Diese Einstellungen waren z. T. übereinstimmend mit den von Schäfer-Somi und Aurich (2007) für das SpermVision™-System verwendeten Einstellungen (siehe Tab. 25 und Tab. 26), welche auch bereits mehrfach eingesetzt wurden (Eulenberger et al., 2009; Koderle et al., 2009; Witte et al., 2009; Kmenta et al., 2011). Die Unterschiede in den technischen Einstellungen könnten durch unterschiedliche Versionen des SpermVision™-Systems oder durch eine benutzerdefinierte Modifikation der Einstellungen bedingt sein.
Die gewählten Einstellungen wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl für die Messung der Nativejakulate als auch für die Messung des flüssigkonservierten Spermas verwendet. Dadurch war ein direkter Vergleich der Messergebnisse vor

und nach Flüssigkonservierung möglich, ohne dass eine Beeinflussung durch verschiedene Einstellungen auftreten konnte.

Tab. 25: Vergleichende Darstellung der verwendeten technischen Einstellungen für die Motilitätsanalyse mit den von Schäfer-Somi und Aurich (2007) genutzten Einstellungen (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis)

Parameter	verwendete Einstellung	Schäfer-Somi und Aurich, 2007
Probenschichtdicke	20 µm	20 µm
Pixel zu µm Verhältnis	168 zu 100	keine Angabe
Spermienerkennung	20-60 µm^2	35 µm^2
Zählkriterien	4000 Spermien oder 8 Felder	7 Felder mit 100 Zellen pro Feld
Punkte bei der Spermienbewegung	11	keine Angabe
Gesamtmotilität	Die Gesamtmotilität ergibt sich aus der Summe der lokal- und der vorwärts-beweglichen Spermien.	VCL > 15 µm/s
unbewegliche Spermien	AOC < 9,5°	AOC < 9,5°
lokalbewegliche Spermien	DSL < 6,0 µm	keine Angabe
vorwärtsbewegliche Spermien	Jede Zelle, die nicht als „unbeweglich“ oder „lokalbeweglich“ eingestuft wurde.	VCL > 15 µm/s, STR > 0,9 (schnell vorwärtsbewegliche Spermien)
hyperaktive Spermien	VCL > 118 µm/s, ALH > 6,5 µm und LIN < 0,5	VCL > 118 µm/s, ALH > 6,5 µm und LIN < 0,5
lineare Spermien	STR > 0,9 und LIN > 0,5	STR > 0,9 und LIN > 0,5
nicht lineare Spermien	STR ≤ 0,9 und LIN ≤ 0,5	keine Angabe
kurvilineare Spermien	DAP/Radius ≥ 3 und LIN < 0,5	keine Angabe

Die Einstellungen zur Spermienerkennung für die Motilitätsanalyse (Tab. 25) entsprachen den vom Hersteller empfohlenen Analyseeinstellungen. Die Definition von Größenwerten ist essentiell, um eine Unterscheidung zwischen Spermienköpfen und anderen Zellen, welche eventuell im untersuchten Ejakulat vorhanden sind, zu gewährleisten (Verstegen et al., 2002). Der spezifizierte Flächenbereich zur Spermienerkennung betrug in den vorliegenden Untersuchungen 20 bis 60 µm^2. Dies entspricht den in der Literatur gefundenen Größenangaben für canine Spermien, nach denen die Dimensionen von lebenden,

physiologisch geformten Samenzellen folgende sind: Gesamtlänge ca. 68 µm, Kopflänge ca. 7 µm, Kopfbreite ca. 4-5 µm, Mittelstücklänge ca. 11 µm und Schwanzlänge ca. 50 µm (Bartlett, 1962a; Christiansen, 1984b; Dahlbom et al., 1997; Rijsselaere et al., 2004a). Daraus ergibt sich eine Kopffläche von etwa 28-35 µm^2, welche somit innerhalb der Grenzen des spezifizierten Flächenbereichs lag. Nach Dahlbom et al. (1997) und Rijsselaere et al. (2004a) beträgt die durchschnittliche Kopffläche caniner Spermien sogar nur etwa 20 µm^2, was die untere Grenze des spezifizierten Flächenbereichs zur Spermienerkennung bei der Motilitätsanalyse darstellte. Obgleich die Einstellungen zur Spermienerkennung gemessen anhand der in der Literatur gefundenen Angaben zur Spermiengröße realistisch erscheinen, konnte in einigen Fällen dennoch eine schlechte Spermienerkennung während der Motilitätsanalyse beobachtet werden.

Bei den vom Hersteller empfohlenen und daher auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Analyseeinstellungen für die Viabilitätsanalyse (siehe Kap. 9.2) betrug der spezifizierte Flächenbereich zur Spermienerkennung für die grüne Fläche 20 bis 600 µm^2 (maximale Fläche der einzelnen Zelle 150 µm^2) und für die rote Fläche 10 bis 800 µm^2 (maximale Fläche der einzelnen Zelle 200 µm^2). Es ist ersichtlich, dass die Untergrenzen gleich bzw. niedriger waren, verglichen mit den Einstellungen für die Motilitätsanalyse, während die Obergrenzen deutlich höher lagen. Der Grund für diese unterschiedlichen Einstellungen ist unbekannt. Bei den vorliegenden Untersuchungen fiel allerdings auf, dass die Spermienerkennung bei der Viabilitätsmessung im Vergleich zur Motilitätsmessung z. T. als schlechter zu beurteilen war. Ob und inwieweit dies jedoch auf die unterschiedlichen Einstellungen hinsichtlich der Spermienerkennung zurückzuführen war, blieb ungeklärt. Insgesamt wurde aber deutlich, dass die CASA-Einstellungen eventuell verbesserungswürdig sind, um die Spermienerkennung zu maximieren.

Tab. 26: Vergleichende Darstellung der sonstigen verwendeten technischen Einstellungen mit den von Schäfer-Somi und Aurich (2007) genutzten Einstellungen (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis)

Parameter	verwendete Einstellung	Schäfer-Somi und Aurich, 2007
Lichteinstellung bei Motilitätsanalyse	80-110	96-104
Volumen pro Messkammer	2,5 µl	3,0 µl
Analysetemperatur	37°C	37°C
Framerate (Bildfrequenz)	60 Frames/s	60 Frames/s
Volumen von SYBR-14/PI pro Tube	2,5 µl (+ 10 µl Sperma)	3,0 µl (+ 100 µl Sperma)
Inkubationszeit	10 Minuten	10 Minuten

Wie aus Tab. 26 ersichtlich wurde in der vorliegenden Arbeit, übereinstimmend mit Schäfer-Somi und Aurich (2007), mit einer Framerate von 60 Frames/s gearbeitet, was ebenso den Empfehlungen anderer Autoren entsprach (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a; Rijsselaere et al., 2003; Amann und Katz, 2004). Die Framerate ist für die genaue Identifizierung und Rekonstruierung der Bewegungsbahnen der einzelnen Samenzellen von Bedeutung und beeinflusst daher die verschiedenen Motilitätsparameter (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003; 2005; Schäfer-Somi und Aurich, 2007).

Neben den technischen Einstellungen sind auch die verwendeten Messkammern und insbesondere deren Tiefe von Bedeutung, da durch sie die Motilität der Samenzellen beeinflusst wird (Verstegen et al., 2002). In Übereinstimmung mit Rijsselaere et al. (2003) kamen in der vorliegenden Arbeit sog. Leja-Messkammern, welche aus einem Objektträger mit jeweils vier Kammern mit einer standardisierten Tiefe von 20 µm bestehen, zum Einsatz. Dies entsprach dem vom Hersteller empfohlenen Zubehör für die Nutzung des SpermVision™-Systems; auch von anderen Autoren werden 20 µm tiefe Messkammern verwendet (Schäfer-Somi et al., 2006; Schäfer-Somi und Aurich, 2007).

Weiterhin ist die Einhaltung einer konstanten Analysetemperatur von 37°C ein zu beachtender Faktor (Amann und Katz, 2004), auf dessen Bedeutung bereits zuvor eingegangen wurde (Kap. 5.2.3.1). Ferner wurde darauf geachtet, die Messung innerhalb einer Minute nach Beschickung der Messkammer abzuschließen, da nach Smith und England (2001) Inkubationszeiten von mehr als einer Minute zu einer negativen Beeinflussung der Spermaqualität führen.

Aufgrund der hohen Dichte der zweiten Ejakulatfraktion ist für die Untersuchung mittels CASA üblicherweise eine Verdünnung notwendig (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003; Schäfer-Somi und Aurich, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nur die Nativejakulate verdünnt, bei denen das SpermVision™-System wegen zu hoher Dichte eine Fehlermeldung machte. Besser wäre es allerdings gewesen, alle Ejakulate auf eine einheitliche Konzentration (50-100 x 10^6 Spermien pro ml) zu verdünnen, wie es auch in der Literatur empfohlen wird (Günzel-Apel et al., 1993; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a; Rijsselaere et al., 2003; Schäfer-Somi und Aurich, 2007), um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, da durch die Verdünnung die Motilität und die Membranintegrität der Spermien beeinflusst werden (Schäfer-Somi und Aurich, 2007). Diese Beeinflussung ist abhängig vom Grad der Verdünnung und dem verwendeten Verdünnermedium (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a; Smith und England, 2001; Amann und Katz, 2004). Das Verdünnermedium sollte keine Partikel enthalten, die in ihrer Größe ähnlich den Dimensionen der Spermienköpfe sind (z. B. nicht-geklärtes Eigelb oder Vollmilch-Verdünner), da diese bei Anwendung von CASA-Systemen sonst nicht von unbeweglichen Samenzellen unterschieden werden können (Verstegen et al., 2002), was zu einer Überschätzung des Anteils an immotilen Spermien führen kann (Ponglowhapan et al., 2004). Bei der Verdünnung der Nativejakulate für die Messungen mittels CASA wurde diese Forderung eingehalten, indem auf 37°C angewärmtes Auftaumedium verwendet wurde, welches keine Partikel enthielt. Die flüssigkonservierten Ejakulate, die für die CASA-Messungen nur vereinzelt verdünnt werden mussten (einige Halteproben von mit Up 1 verdünnten Ejakulaten), enthielten hingegen von vornherein alle Eigelb, da alle getesteten Verdünner eigelbhaltig waren. Allerdings war die Unterscheidung des SpermVision™-Systems zwischen Eigelbpartikeln und Spermienköpfen bei allen Messungen als gut zu beurteilen, sodass hieraus vermutlich keine Überschätzung des Anteils an unbeweglichen Samenzellen resultierte. Fraglich ist jedoch, ob und wie das für die Verdünnung der Nativejakulate verwendete Auftaumedium die gemessenen Motilitätswerte beeinflusst hat. Im Vergleich zu physiologischer Kochsalzlösung, welche keine Energiesubstrate enthält (Rijsselaere et al., 2003), beinhaltete das Auftaumedium Fruktose als Energiesubstrat. Andererseits wird Auftaumedium normalerweise kryokonserviertem Sperma nach dem Auftauen zugesetzt, um dessen Motilität zu steigern und es kann auch frischem oder

flüssigkonserviertem Sperma vor der Verwendung zur KB beigegeben werden, um dort den gleichen Effekt zu erzielen. Vor diesem Hintergrund ist der Einsatz von Auftaumedium zur Verdünnung der Ejakulate für die CASA-Messungen praxisorientiert und daher auch in der vorliegenden Arbeit zu vertreten.

5.2.3.2.1 Konzentrationsbestimmung

Nach Iguer-Ouada und Verstegen (2001a) kommt es durch CASA-Systeme meist zu einer Überschätzung der Spermienkonzentration, welche mit steigender Verdünnung zunimmt. Im Gegensatz dazu konnten Rijsselaere et al. (2003) eine Unterschätzung der Spermienkonzentration durch CASA beobachten, welche mit steigenden Spermienkonzentrationen größer wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration der Ejakulate durch das SpermVision™-System während der Motilitätsanalyse bestimmt. Tendenziell war übereinstimmend mit Rijsselaere et al. (2003) eher eine Unterschätzung der Spermienkonzentration (im Vergleich mit den durch die Neubauer-Zählkammer bestimmten Werten) festzustellen. Diese war insbesondere bei den Nativejakulaten stark ausgeprägt (siehe Kap. 4.1.3 und Kap. 4.1.6), konnte in geringerem Maße jedoch auch bei den verdünnten Ejakulaten beobachtet werden (siehe Kap. 4.2.1). Die größeren Abweichungen bei den Nativejakulaten unterstützen die Aussage von Rijsselaere et al. (2003), dass die Unterschätzung der Spermienkonzentration mit steigenden Spermienkonzentrationen zunimmt. Auf die statistisch ermittelten Zusammenhänge zwischen beiden Methoden der Konzentrationsbestimmung wird in Kap. 5.3.4.1 näher eingegangen.

5.2.3.2.2 Motilitätsanalyse

Grundsätzlich fiel bei der Motilitätsanalyse durch das SpermVision™-System auf, dass es bei subjektiv als gut bewerteten Ejakulaten bei Messung durch SpermVision™ zu einer Unterschätzung der Motilität kam und bei subjektiv als eher schlecht beurteilten Ejakulaten zu einer Überschätzung der Motilität. Dies war sowohl bei der Motilitätsanalyse der Nativejakulate als auch bei der Motilitätsanalyse der flüssigkonservierten Ejakulate zu beobachten. Aufgrund dessen scheint eine kritische Beurteilung der gemessenen Motilitätswerte erforderlich. Ebenso kann jedoch auch an der Aussagekraft der subjektiven Motilitätsschätzung gezweifelt werden, zudem in der Literatur für die subjektive mikroskopische Untersuchung über hohe Variationen bei der Beurteilung der

Motilitätsparameter derselben Ejakulate durch verschiedene Untersucher berichtet wird (Dunphy et al., 1989).

Eine Überschätzung der Motilität durch CASA bei subjektiv als schlecht beurteilten Ejakulaten konnte in ähnlicher Weise auch von Amann und Hammerstedt (1980) beobachtet werden: Bei Proben, die nur tote Bullenspermien enthielten, wurden durch CASA trotzdem 31 % bewegliche Spermien ermittelt. Daher sind die Autoren der Ansicht, dass CASA-Untersuchungen nur für Ejakulate, die einen hohen Prozentsatz an motilen Spermien aufweisen (> 50 %), genaue und verlässliche Ergebnisse liefern, welche auch mit den Ergebnissen subjektiver Schätzungen gut übereinstimmen. Bei Ejakulaten, die nur wenige bewegliche Spermien enthalten (< 25 %), sind CASA-Untersuchungen jedoch ungenau (Amann und Hammerstedt, 1980).

Insgesamt betrachtet war die Übereinstimmung der durch das SpermVision™-System ermittelten Motilitätswerte mit den subjektiv geschätzten Werten trotz einiger Ausnahmen jedoch als zufriedenstellend zu beurteilen, wobei die durch SpermVision™ gemessenen Werte im Durchschnitt unter den subjektiv bestimmten Werten lagen (siehe Kap. 4.4.2.2). Auf die statistisch ermittelten Zusammenhänge zwischen beiden Methoden wird in Kap. 5.3.4.2 näher eingegangen.

5.2.3.2.3 Viabilitätsanalyse

Das CASA-System SpermVision™ ist im Vergleich zu anderen CASA-Systemen in der Lage, zusätzlich zu den Motilitätsparametern die Zellmembranintegrität objektiv zu beurteilen (Schäfer-Somi und Aurich, 2007). Diese Viabilitätsanalyse basiert auf einer Fluoreszenzfärbung der Spermien mit SYBR-14/PI. Abweichend von Schäfer-Somi und Aurich (2007), die 3,0 µl des SYBR-14/PI-Gemisches mit 100 µl Sperma inkubieren, wurden in der vorliegenden Arbeit 2,5 µl SYBR-14/PI mit 10 µl Sperma inkubiert. Die Inkubationszeit von zehn Minuten war jedoch übereinstimmend mit der von Schäfer-Somi und Aurich (2007) (siehe Tab. 26). Weitere die Viabilitätsanalyse betreffende Einstellungen können nicht miteinander verglichen werden, da hierzu von Schäfer-Somi und Aurich (2007) keine Angaben gemacht werden.

Fluoreszenzgefärbte Spermien können auf ihre funktionellen und morphologischen Aspekte hin untersucht werden, ohne dass es zu einer Interferenz mit extrazellulären Medien kommt, was insbesondere bei konserviertem Sperma von

Bedeutung ist (Peña Martínez, 2004). SYBR-14/PI färbt selektiv nur die Samenzellen an, wodurch eine Differenzierung von anderen im Medium enthaltenen Partikeln möglich wird (Peña et al., 2006). Aus diesem Grund stellten in der vorliegenden Arbeit die Eigelbpartikel in den flüssigkonservierten Ejakulaten kein Problem für die Spermienerkennung dar. Allerdings kam es - subjektiv betrachtet - bei einigen Messungen durch eine schlechte Spermienerkennung zu einer Unterschätzung der Viabilität durch das SpermVision™-System. Teilweise war dies durch eine schwache Fluoreszenz der Samenzellen bedingt, welche auch durch erneute Färbung und Inkubation nicht verbessert werden konnte. Eine sukzessive Abnahme der Intensität der grünen Fluoreszenz in mit TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünner mit Zusatz von 1 % Equex STM aufgearbeiteten Ejakulaten konnte während fortschreitender Inkubationsdauer bei 5°C auch von Niżański und Klimowicz (2005) beobachtet werden. Jedoch wurden in den eigenen Untersuchungen bei einigen Messungen auch bei ausreichender Fluoreszenz der Samenzellen nicht alle Spermien vom SpermVision™-System als solche identifiziert.

Der in der vorliegenden Studie durchgeführte Vergleich der Ergebnisse der Viabilitätsanalyse mittels CASA nach SYBR-14/PI-Färbung mit denen der konventionellen Beurteilung des Lebend-Tot-Anteils im Eosinausstrich lieferte eine akzeptable Übereinstimmung zwischen beiden Methoden (siehe Kap. 4.4.3), welche in Kap. 5.3.4.3 näher beschrieben wird.

5.2.4 Verdünner

Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Verdünner wurden ausgewählt, da sie kommerziell erworben werden können bzw. einfach herzustellen sind und deshalb in der klinischen Praxis z. T. weitverbreitet eingesetzt werden.

Der kommerzielle Verdünner CP bietet die Vorteile, dass er schnell verfügbar und einfach anzuwenden ist. Zudem ist eine Vorratshaltung möglich. Bei kühler, trockener und dunkler Lagerung zwischen + 2°C und + 8°C können die den Verdünner enthaltenden Flaschen über ein Jahr lang gelagert werden. Vor Gebrauch muss lediglich die entsprechende Menge an Eigelb zugesetzt werden, was die Handhabung dieses Verdünners leicht macht, da keine Herstellung nach Rezept mit Abwiegen einzelner Komponenten nötig ist.

Im Gegensatz zum vorgenannten Verdünner handelte es sich beim Verdünner TE und beim Uppsala Equex-2 System-Verdünner um nichtkommerzielle Verdünner,

welche im eigenen Labor selbst hergestellt wurden. Hierzu müssen die benötigten Geräte und Chemikalien vorhanden sein, was einen Hinderungsgrund für den Einsatz in der tierärztlichen Praxis darstellen könnte. Zudem ist der arbeitstechnische Aufwand im Vergleich zu kommerziellen Verdünnern wesentlich höher und zeitintensiver. Allerdings ist die eigene Herstellung bei häufiger Nachfrage günstiger als der kommerzielle Erwerb – vorausgesetzt, die nötigen Geräte stehen zur Verfügung und müssen nicht extra gekauft werden.

5.2.4.1 Inhaltsstoffe

Zwischen den drei untersuchten Verdünnern existierten bezüglich der Inhaltsstoffe neben einigen Gemeinsamkeiten auch wesentliche Unterschiede, welche bei der Interpretation der Versuchsergebnisse berücksichtigt werden müssen.
Da es sich bei dem Verdünner CP um einen kommerziellen Verdünner handelte, war seine genaue Zusammensetzung nicht bekannt. Es lagen lediglich die Herstellerangaben vor. Demnach enthielt der Verdünner neben dem zugesetzten Eigelb Reinstwasser, Natriumzitrat, TRIS, Glukose, Fruktose, herstellereigene Bestandteile und Gentamicin. Was unter den herstellereigenen Bestandteilen zu verstehen war, blieb offen. Auch gab es keine exakten Mengenangaben zu den einzelnen Inhaltsstoffen. Nur die Menge des Eigelbs war bekannt (20 %), da dieses selbst hinzugefügt werden musste. Aufgrund dessen können hinsichtlich der Effekte der einzelnen Inhaltsstoffe auf die Versuchsergebnisse nur begrenzt Aussagen gemacht werden.
Eine Gemeinsamkeit der drei getesteten Verdünner bestand in den verwendeten Puffersubstanzen. Alle drei Verdünner enthielten TRIS; der Verdünner TE und der Uppsala Equex-2 System-Verdünner in gleichen Mengen. Beim Verdünner CP konnte, wie oben bereits erwähnt, bezüglich der enthaltenen Menge an TRIS keine Aussage gemacht werden. Der Verdünner TE und der Uppsala Equex-2 System-Verdünner beinhalteten zusätzlich Zitronensäure (ebenfalls in gleichen Mengen), wohingegen im Verdünner CP Natriumzitrat als zweite Puffersubstanz Verwendung fand.
Weiterhin waren alle drei Verdünner eigelbhaltig und besaßen einen Eigelbanteil von 20 %. Nachteilig an Eigelb ist, dass es sich um ein biologisch riskantes Produkt tierischen Ursprungs handelt (Bergeron und Manjunath, 2006; Farstad, 2009), dessen Zusammensetzung extrem variabel ist (Bergeron und Manjunath, 2006; Beccaglia et al., 2009a). Daher kann die Gleichförmigkeit der mit

Eigelbzusatz hergestellten Verdünner nicht sicher gewährleistet werden, was den Bestrebungen, vorzugsweise definierte Medien zu verwenden, um möglichst standardisiert zu arbeiten, widerspricht. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, dieses Problem zu umgehen, indem alle Verdünner im Vorhinein mit Eiern derselben Herkunft hergestellt und bis zur Verwendung portioniert bei - 21°C gelagert wurden. So konnte für den Vergleich der getesteten Verdünner untereinander eine annähernde Konsistenz bezüglich der Zusammensetzung des Eigelbs sichergestellt werden.

Die Zuckerkomponente in den drei untersuchten Verdünnern war Fruktose. Dabei enthielten der Verdünner TE und der Uppsala Equex-2 System-Verdünner die gleiche Menge an Fruktose. Im Verdünner CP war neben Fruktose auch Glukose enthalten. Glukose und Fruktose sind die am häufigsten genutzten Zucker in Verdünnern für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma (Ponglowhapan et al., 2004). Glukose bedingt eine mehr oszillatorische Bewegung, während Fruktose ein schnelleres und mehr lineares Bewegungsmuster verursacht. Allerdings verändert sich der Prozentsatz an motilen Spermien weder durch Fruktose noch durch Glukose (Rigau et al., 2001). Welcher Zucker (Fruktose oder Glukose) als Energiezusatz besser geeignet ist, wird kontrovers diskutiert (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Ponglowhapan et al., 2004). Übereinstimmend mit Ponglowhapan et al. (2004), welche einen TRIS-Eigelb-Verdünner mit einer Fruktosekonzentration von 70 mM als am besten geeignet für die Langzeitkonservierung von Flüssigsperma ansehen, wurden in der vorliegenden Arbeit Verdünner mit einer Fruktosekonzentration von etwa 70 mM (Verdünner TE, Uppsala Equex-2 System-Verdünner) gewählt.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den drei getesteten Verdünnern bestand im Zusatz von Glycerol. Während die Verdünner CP und TE kein Glycerol enthielten, war im Uppsala Equex-2 System-Verdünner Glycerol enthalten. Dies ließ sich dadurch erklären, dass es sich bei diesem Verdünner eigentlich um einen Verdünner für die Kryokonservierung von caninem Sperma handelt und daher der Zusatz eines Kryoprotektivums essentiell ist. Glycerol ist das am häufigsten verwendete Kryoprotektivum für Hundesperma (Concannon und Battista, 1989; Martins-Bessa et al., 2006; Rota et al., 2006; Futino et al., 2010). Verdünner 1 des Uppsala Equex-2 System-Verdünners enthielt 3 % Glycerol und Verdünner 2 einen Anteil von 7 %, was eine Endkonzentration von 5 % Glycerol im Uppsala Equex-2 System-Verdünner ergab. Diese Konzentration entspricht den in der Literatur

verwendeten Endkonzentrationen in Verdünnern für die Kryokonservierung von caninem Sperma (Rota et al., 1999a; 2006). Allerdings wird Glycerol üblicherweise nicht in Verdünnern für die Flüssigkonservierung von Hundesperma eingesetzt, da es in niedrigen Konzentrationen (3 %) keinen vorteilhaften Effekt auf die Motilität ausübt und in höheren Konzentrationen (6 %) sogar zu einer Reduktion der Motilität von flüssigkonservierten Hundespermien führt (Province et al., 1984). Diese in der Literatur gefundene Aussage konnte in der vorliegenden Arbeit durch die beim Uppsala Equex-2 System-Verdünner erfolgte Aufteilung in die Versuchsteile I und II gut verifiziert werden (siehe Kap. 5.3.2.2 und Kap. 5.3.3.1).
Weiterhin unterschieden sich die drei untersuchten Verdünner bezüglich des Antibiotikazusatzes. Im Verdünner CP war Gentamicin enthalten, während bei der Herstellung des Verdünners TE und des Uppsala Equex-2 System-Verdünners abweichend vom Rezept bewusst auf den Zusatz von Penicillin und Streptomycin verzichtet wurde. Obwohl nach Hoffmann (2003d) bei der Flüssigkonservierung der Zusatz von Antibiotika generell angebracht erscheint und auch nach Linde-Forsberg (1995) insbesondere bei der Verwendung von eigelbhaltigen Verdünnern Antibiotika zugesetzt werden sollten, da Eigelb das bakterielle Wachstum begünstigt, wurden in der vorliegenden Arbeit bei den selbst hergestellten Verdünnern keine Antibiotikazusätze verwendet. Es sollte gezeigt werden, dass auch ohne den Einsatz von Antibiotika eine angemessene Spermaqualität über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden kann. Dies entspricht dem derzeitigen Bestreben in der Veterinärmedizin, den Einsatz von Antibiotika auf das notwendige Minimum zu beschränken. Allerdings wurden keine mikrobiologischen Untersuchungen der Ejakulate durchgeführt, sodass keine Aussagen darüber gemacht werden können, ob und wie stark sich eventuell in den Ejakulaten vorhandene Keime während des Untersuchungszeitraumes vermehrt haben. Dieser Unterschied bezüglich des Antibiotikazusatzes muss bei der Interpretation der Versuchsergebnisse Beachtung finden.
Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen den drei untersuchten Verdünnern bestand im Zusatz von Equex STM Paste (Equex), welche nur im Verdünner 2 des Uppsala Equex-2 System-Verdünners enthalten war. Der Zusatz von Equex zu einem konventionellen TRIS-Gefrierverdünner verbessert die Viabilität und die Langlebigkeit der Spermien nach dem Auftauen (Rota et al., 1997), führt zu einer höheren Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit nach dem Auftauen (Rota et al., 1999a; Alhaider und Watson, 2009) und besitzt eine positive Auswirkung auf die

ZP-Bindungsfähigkeit von kryokonservierten Spermien (Ström Holst et al., 2000; 2001). Im Gegensatz dazu konnten Niżański et al. (2009) zeigen, dass durch den Zusatz von Equex zu einem TRIS-Eigelb-Verdünner zur Flüssigkonservierung von caninem Sperma bei 5°C die Lebensdauer der Spermien verkürzt wird. Sie sehen den Zusatz von Equex zu Verdünnern für die Flüssigkonservierung als ungeeignet an, da der Prozentsatz an motilen Samenzellen nur für drei Tage zufriedenstellende Werte zeigt, während bei Proben ohne Equex-Zusatz über sieben Tage gute Werte erzielt werden können. Auch diese in der Literatur gefundene Aussage konnte in der vorliegenden Arbeit durch die beim Uppsala Equex-2 System-Verdünner erfolgte Aufteilung in die Versuchsteile I und II gut überprüft werden (siehe Kap. 5.3.2 und Kap. 5.3.3), da nur Verdünner 2 des Uppsala Equex-2 System-Verdünners Equex enthielt und somit nur in Versuchsteil I Effekte eines Zusatzes von Equex auftreten konnten.

5.2.4.2 Unterschiede bezüglich der Aufarbeitung

Die Aufarbeitung der Nativejakulate mit den drei verschiedenen Verdünnern erfolgte im Anschluss an die Spermauntersuchung parallel. Dabei wurde für die Verdünner CP und TE stets nach dem gleichen Schema verfahren (siehe Kap. 3.4.2): Die entsprechenden Aliquote wurden je nach der Dichte des Nativspermas ohne weitere Vorbehandlung mit den einphasigen Verdünnern versetzt und anschließend im Kühlschrank auf 4°C abgekühlt. Im Gegensatz dazu wurde für die Aufarbeitung mit dem zweiphasigen Uppsala Equex-2 System-Verdünner das gleiche Protokoll verwendet, wie es in der Literatur für den Kryokonservierungs-prozess beschrieben wird (Rota et al., 1997; 1999a; Peña und Linde-Forsberg, 2000; Linde-Forsberg, 2001; Peña et al., 2003b; Hermansson und Linde-Forsberg, 2006), nur ohne folgende Kryokonservierung (siehe Kap. 3.4.2). Wesentliche Unterschiede, verglichen mit der Aufarbeitung der Ejakulate mit den anderen beiden (einphasigen) Verdünnern, waren dabei die Zentrifugation der Nativejakulate mit folgendem Abpipettieren des Seminalplasma-Überstandes (Versuchsteile I und II) und die einstündige Äquilibrierung bei 4°C nach dem Zusatz von Verdünner 1 bzw. vor dem Zusatz von Verdünner 2 (nur Versuchsteil I). Diese Unterschiede bezüglich der Aufarbeitung müssen bei der Interpretation der Versuchsergebnisse Berücksichtigung finden, da insbesondere die Auswirkungen von Seminalplasma auf den Konservierungserfolg und die Effekte der Zentrifugation auf die Samenzellen in der Literatur kontrovers diskutiert

werden (siehe Kap. 2.4.1.1). Weiterhin ist zu beachten, dass in Versuchsteil I, bedingt durch die einstündige Äquilibrierung bei 4°C, die Untersuchung der mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Aliquote nicht zeitgleich mit der Untersuchung der mit CP und der mit TE aufgearbeiteten Aliquote erfolgte. Letztere wurden unmittelbar nach dem Verdünnen untersucht, während die mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Aliquote erst nach vorheriger Abkühlung auf 4°C und anschließendem Wiedererwärmen auf 37°C untersucht wurden.
Durch die unterschiedliche Aufarbeitung mit den verschiedenen Verdünnern kam es auch zu Unterschieden in den Endverdünnungen der flüssigkonservierten Ejakulate. Die mit CP und die mit TE aufgearbeiteten Aliquote hatten aufgrund des gleichen Aufarbeitungsschemas annähernd die gleichen Endkonzentrationen. Für die mit dem Uppsala Equex-2 System-Verdünner aufgearbeiteten Aliquote galt dies nur in Versuchsteil I (Endverdünnung 1 : 4), wobei auch hier mittels Neubauer-Zählkammer teilweise höhere Spermienkonzentrationen bestimmt werden konnten als in den mit CP und in den mit TE verdünnten Aliquoten, was vermutlich durch die Zentrifugation der Nativejakulate vor der Aufarbeitung bedingt war. In Versuchsteil II (Endverdünnung 1 : 2) hatten die mit dem Uppsala Equex-2 System-Verdünner aufgearbeiteten Aliquote sowohl bei Bestimmung mit der Neubauer-Zählkammer als auch bei Messung mittels CASA deutlich höhere Endkonzentrationen als die mit CP und die mit TE aufgearbeiteten Aliquote. Dies war durch die Änderung im Versuchsaufbau bedingt. Während in Versuchsteil I Verdünner 1 und Verdünner 2 des Uppsala Equex-2 Systems zum Einsatz kamen (Up 1 + 2), wurde in Versuchsteil II nur Verdünner 1 verwendet (Up 1). Grund für diese Modifikation im Versuchsaufbau waren die schlechten Konservierungsergebnisse bei Verdünnung der Ejakulate mit dem kompletten Uppsala Equex-2 System (siehe Kap. 4.3). Um nicht zu stark vom Uppsala-Verfahren abzuweichen, wurden die entsprechenden Aliquote in Versuchsteil II jedoch trotzdem nur im Verhältnis 1 : 2 verdünnt. Dies geschah auch im Hinblick darauf, dass in der Praxis nur mit Verdünner 1 des Uppsala Equex-2 Systems aufgearbeitete Ejakulate nach der Flüssigkonservierung noch mit Verdünner 2 versetzt und anschließend kryokonserviert werden könnten. So könnten beispielsweise in der Praxis Ejakulate gewonnen und mit Verdünner 1 aufgearbeitet werden, um sie im Anschluss in flüssigkonserviertem Zustand an eine Einrichtung zu versenden, die dann die weitere Aufarbeitung und Kryokonservierung durchführt. Vor diesem Hintergrund wurden die Aliquote in

Versuchsteil II nur mit Verdünner 1 des Uppsala Equex-2 Systems flüssigkonserviert. Nachteilig an dieser Vorgehensweise war, dass die verdünnten Ejakulate, wie bereits in Kap. 5.2.3.2 erwähnt, für die CASA-Messungen z. T. nochmals verdünnt werden mussten. Insgesamt müssen diese Unterschiede in den Endverdünnungen der flüssigkonservierten Ejakulate insbesondere für die Interpretation der durch CASA bestimmten Messwerte berücksichtigt werden, da bekannt ist, dass verschiedene Motilitätsparameter in Abhängigkeit vom Grad der Spermaverdünnung beeinflusst werden (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a; Smith und England, 2001).

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Nativejakulate

5.3.1.1 Klassische Spermatologie

Die in den Nativejakulaten untersuchten Spermaparameter variierten zwischen den verschiedenen Rüden, so wie es auch im klinischen Alltag der Fall ist, entsprachen dabei aber größtenteils den in der Literatur beschriebenen physiologischen Referenzwerten für Rüdensperma (Günzel, 1986; England, 1999; Riesenbeck et al., 2001; Hoffmann, 2003b; Günzel-Apel, 2007). Ausnahmen bildeten einzelne Parameter in den Ejakulaten der Hunde Nr. 1, 2, 6, 7, 9, 11 und 24, wobei es sich meist um einen leicht erhöhten Anteil an Samenzellen mit Kopfkappenveränderungen in der Spermac®-Färbung handelte (Nr. 1, 2, 6, 7, 9 und 11). Bei Hund Nr. 7 war zusätzlich ein erhöhter Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen und bei Hund Nr. 24 eine verminderte SGZ im Ejakulat zu beobachten. Die genannten Abweichungen von den physiologischen Referenzbereichen waren jedoch für die vorliegenden Untersuchungen nicht weiter relevant, da die Proben vor und nach der Flüssigkonservierung individuelle Berücksichtigung fanden.

5.3.1.2 CASA

Für die mittels CASA bestimmten Motilitätsparameter sowie für die mittels CASA nach SYBR-14/PI-Färbung bestimmte Viabilität ließen sich in der Literatur keine Referenzbereiche für Rüdensperma finden. Daher konnten die vorliegenden

Ergebnisse nur mit denen anderer Veröffentlichungen verglichen werden. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass es z. T. Unterschiede bezüglich der genutzten CASA-Systeme und der eingesetzten Verdünnungen bzw. Verdünnermedien gibt. In der Literatur konnten nur wenige Arbeiten gefunden werden, in denen die CASA-Messungen ohne vorherige Verdünnung der Nativejakulate erfolgten, so wie es in der vorliegenden Arbeit größtenteils der Fall war. Auf die Problematik hinsichtlich der Verdünnung der Nativejakulate für die Beurteilung mittels CASA bei den vorliegenden Untersuchungen wurde bereits in Kap. 5.2.3.2 hingewiesen.
Verglichen mit den von Schäfer-Somi und Aurich (2007) mittels SpermVision™ und verschiedenen Verdünnermedien bestimmten Motilitätswerten, waren die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zwar für einige Motilitätsparameter ähnlich, überwiegend jedoch niedriger; insbesondere die Gesamtmotilität und die Vorwärtsbeweglichkeit lagen deutlich niedriger als bei Schäfer-Somi und Aurich (2007). Ausnahmen bildeten die Parameter ALH und WOB, welche geringgradig höhere Werte zeigten. Ebenso war die durch CASA bestimmte Viabilität in der vorliegenden Arbeit deutlich niedriger als bei Schäfer-Somi und Aurich (2007). Insgesamt sprach dies für eine tendenziell geringere Spermaqualität der Nativejakulate in der vorliegenden Untersuchung, welche jedoch wahrscheinlich durch das größere und heterogene Probandenkollektiv bedingt war, wohingegen Schäfer-Somi und Aurich (2007) ausschließlich Ejakulate von sechs klinikseigenen Beagle-Rüden im Alter von zwei bis vier Jahren verwendeten. Bezüglich der Viabilität muss zudem der Unterschied in der Methodik sowie die teils schlechte Spermienerkennung durch das SpermVision™-System berücksichtigt werden (siehe Kap. 5.2.3.2.3).
Im Vergleich mit den mittels SpermVision™ gemessenen Ergebnissen von Schäfer-Somi et al. (2006), Eulenberger et al. (2009) und Koderle et al. (2009) waren die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werte für die Nativejakulate zwar für viele Motilitätsparameter ähnlich, jedoch zeigten auch hier Gesamtmotilität, Vorwärtsbeweglichkeit und Viabilität immer geringere Messwerte als bei den genannten Autoren. Auch verglichen mit den Ergebnissen weiterer Autoren (Günzel-Apel et al., 1993; Rijsselaere et al., 2003; Verstegen et al., 2005; Niżański, 2006; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007; Pinto und Kozink, 2008) waren die in der vorliegenden Studie ermittelten Messwerte für die Gesamtmotilität deutlich niedriger, unabhängig davon, welches CASA-System

(HTR Ceros 12.1, HTR IVOS 10 und 12 bzw. 12.21, Strömberg-Mika Cell Motion Analyzer) von den genannten Autoren genutzt wurde.
Hingegen entsprach die in der vorliegenden Arbeit mittels CASA nach SYBR-14/PI-Färbung bestimmte Viabilität in den Nativejakulaten annähernd den bei Rijsselaere et al. (2002a) und Nizański (2006) gefundenen Werten für canines Nativsperma, welche allerdings nach Verdünnung durch manuelles Auszählen der mit SYBR-14/PI gefärbten Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop (Rijsselaere et al., 2002a) bzw. flowzytometrisch (Nizański, 2006) ermittelt wurden. Weiterhin konnten bei Iguer-Ouada und Verstegen (2001a), welche mit dem HTR IVOS 10 arbeiteten, ähnliche Werte für die Vorwärtsbeweglichkeit und weitere Motilitätsparameter, bei Rigau et al. (2001), welche den Sperm Class Analyzer einsetzten, ein nahezu identischer Wert für die Gesamtmotilität und bei Ellington et al. (1993), welche den Hamilton-Thorne Motility Analyzer nutzten, ähnliche Werte für die Gesamtmotilität, die Vorwärtsbeweglichkeit und andere Motilitätsparameter gefunden werden. Bei Smith und England (2001) ließen sich für die mittels Hobson Sperm Tracker in verdünnten Nativejakulaten ermittelten Motilitätsparameter den in der vorliegenden Arbeit bestimmten Werten ähnliche oder niedrigere Werte finden.
Wie bereits erwähnt, konnten nur wenige Arbeiten gefunden werden, in denen die Motilitätsparameter in den Nativejakulaten ohne vorherige Verdünnung gemessen wurden: Bei Mogas et al. (1998) kam hierfür der Sperm Class Analyzer zum Einsatz. Die ermittelten Werte waren mit Ausnahme der Gesamtmotilität jedoch deutlich niedriger als die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Messwerte. Ob und inwieweit dies im Zusammenhang mit der nicht erfolgten Verdünnung vor den CASA-Messungen zu sehen ist, bleibt offen, da auch eine geringere Spermaqualität der genutzten Rüden in Betracht gezogen werden muss, wogegen allerdings die gute Gesamtmotilität der Ejakulate spricht. Bei Rota et al. (2001) erfolgte die Motilitätsmessung in den Nativejakulaten mit dem Hamilton-Thorne Motility Analyzer ebenfalls ohne vorherige Verdünnung. Die ermittelten Werte für die Gesamtmotilität und die Vorwärtsbeweglichkeit waren annähernd identisch mit den in der vorliegenden Arbeit bestimmten Werten. Dagegen zeigten die von Ponglowhapan et al. (2004) in gepooltem, unverdünntem Sperma mittels Strömberg-Mika Cell Motion Analyzer gemessenen Motilitätsparameter tendenziell höhere Werte für die Gesamtmotilität, die Vorwärtsbeweglichkeit und die

Parameter VAP und VSL als in der vorliegenden Arbeit. Lediglich beim Parameter VCL wurden ähnliche Werte ermittelt.
Insgesamt schienen die mittels CASA bestimmten Untersuchungsergebnisse der Nativejakulate bezüglich der Gesamtmotilität und der Vorwärtsbeweglichkeit zwar unter den in der Literatur beschriebenen Durchschnittswerten zu liegen, was jedoch für die vorliegenden Untersuchungen nicht weiter von Bedeutung war, da sie lediglich als Ausgangswerte hinsichtlich der zeitbedingten Veränderungen der verschiedenen Parameter dienten.

5.3.2 Ergebnisse der weiterverarbeiteten Ejakulate unmittelbar nach dem Verdünnen an Tag 0

Während unmittelbar nach dem Verdünnen in den weiterverarbeiteten Ejakulaten im Vergleich zum Nativsperma bezüglich der Motilität (subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit, CASA-Gesamtmotilität, CASA-Vorwärtsbeweglichkeit) und der Viabilität nur wenige signifikante Veränderungen nachgewiesen werden konnten, gab es bei Betrachtung der verschiedenen CASA-Motilitätsparameter, der Pathomorphologie, der akrosomalen Veränderungen und der mittels HOS-Test bestimmten Plasmamembranintegrität einige signifikante Unterschiede zwischen den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten und dem Nativsperma. Insgesamt waren die Effekte der Verdünner an Tag 0 jedoch als gering zu beurteilen. Auch zwischen den verschiedenen Verdünnern untereinander konnten mit Ausnahme der verschiedenen CASA-Motilitätsparameter kaum signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Daher konnte an Tag 0 keiner der getesteten Verdünner statistisch abgesichert als bester Verdünner identifiziert werden. Es waren lediglich tendenzielle Aussagen möglich, nach welchen sich unmittelbar nach dem Verdünnen der Verdünner Up 1 als der am besten geeignetste Verdünner unter den geprüften Verdünnern und der Verdünner Up 1 + 2 als der am schlechtesten geeignetste Verdünner darstellten. Bezüglich der CASA-Motilitätsparameter erwiesen sich hingegen die Verdünner CP und TE an Tag 0 als signifikant überlegen.

5.3.2.1 Dichten

Die Spermienkonzentrationen (Dichten) der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate entsprachen nur teilweise dem angestrebten Wert von 100.000 Spermien pro µl bzw. 100×10^6 Spermien pro ml. In den mit CP, TE und

Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten lagen die durchschnittlichen Dichten sowohl bei manueller Bestimmung mit der Neubauer-Zählkammer als auch bei Bestimmung mittels CASA unter dem angestrebten Wert. In den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten konnten dagegen mit beiden Methoden höhere Werte für die mittleren Dichten ermittelt werden. Letzteres ließ sich durch die in Versuchsteil II erfolgte Änderung im Versuchsaufbau erklären, wonach nur noch Verdünner 1 des Uppsala Equex-2 Systems zum Einsatz kam und daher die Ejakulate grundsätzlich nur noch im Verhältnis 1 : 2 verdünnt wurden (siehe Kap. 5.2.4.2). Grund für die Abweichungen der Dichten der mit CP, TE und Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulate vom angestrebten Wert war möglicherweise ein zu hohes Verdünnungsverhältnis bei der Herstellung der flüssigkonservierten Ejakulate aufgrund einer Überschätzung der Spermienkonzentration in den Nativejakulaten bei der manuellen Dichtebestimmung. Als andere denkbare Ursache könnte eine Sedimentation der Spermien in den Nativejakulaten vor Entnahme der entsprechenden Aliquote zur Herstellung der flüssigkonservierten Ejakulate in Frage kommen. Dagegen spricht allerdings, dass das Gefäß mit dem Sperma vor Entnahme der zu verdünnenden Aliquote stets mehrmals geschwenkt wurde, um eben eine solche Sedimentation der Samenzellen auszuschließen. Weiterhin könnte auch eine Sedimentation der Spermien in den verdünnten Ejakulaten vor der Entnahme des Spermas zur Dichtebestimmung und somit eine fehlerhafte Unterschätzung der Spermienkonzentration ursächlich für die geringeren Dichten sein. Auch hiergegen spricht jedoch das mehrmalige Schwenken der Gefäße vor der Entnahme des Spermas. Letztlich blieb der Grund für die abweichenden Werte ungeklärt, was für die vorliegenden Untersuchungen auch nicht weiter von Bedeutung war. Aufgrund dieser Beobachtungen sollte aber in der Praxis bei der Herstellung von flüssigkonserviertem Sperma, welches zur Verwendung bei mehreren Hündinnen aliquotiert werden soll, verstärkt auf die korrekte Verdünnung der Ejakulate geachtet werden, da die daraus resultierende Spermiendichte und somit auch die SGZ in den flüssigkonservierten Ejakulaten von entscheidender Bedeutung für die Kalkulation der benötigten Besamungsdosis bei Verwendung zur KB ist.

5.3.2.2 Motilität

Unmittelbar nach Zugabe der verschiedenen Verdünner zu den Nativejakulaten konnte bezüglich der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit in allen

verdünnten Ejakulaten eine tendenzielle Motilitätsreduktion beobachtet werden, welche jedoch nur bei den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten als signifikant zu beurteilen war ($p < 0,05$). Zwischen den verschiedenen Verdünnern untereinander gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit.
Bei Betrachtung der CASA-Gesamtmotilität ließ sich nur in den mit CP und Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten eine tendenzielle Abnahme beobachten, während der durchschnittliche Wert in den mit TE verdünnten Ejakulaten nahezu konstant blieb und in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten im Vergleich mit dem Nativsperma sogar anstieg. Bezüglich der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit konnte in den mit CP, TE und Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten eine Reduktion der Motilität gesehen werden und in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten wiederum eine Zunahme. Verglichen mit den Nativejakulaten erwies sich keine der genannten Veränderungen als signifikant. Jedoch ließen sich hinsichtlich der CASA-Gesamtmotilität und der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit signifikante Unterschiede zwischen den Verdünnern CP und Up 1 ermitteln (jeweils mit $p < 0,05$), wobei in Up 1 durchschnittlich höhere Motilitätswerte ermittelt werden konnten.
Im Gegensatz zur CASA-Gesamtmotilität und zur CASA-Vorwärtsbeweglichkeit konnten unmittelbar nach Zugabe der verschiedenen Verdünner zu den Nativejakulaten einheitlich in allen verdünnten Ejakulaten signifikante Abnahmen der durchschnittlichen Werte für die Geschwindigkeitsparameter VAP, VCL und VSL nachgewiesen werden (jeweils mit $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Dabei waren die Reduktionen für alle genannten Parameter in den mit CP verdünnten Ejakulaten am geringsten und in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten am stärksten ausgeprägt. Die mit CP aufgearbeiteten Ejakulate unterschieden sich bezüglich der Geschwindigkeitsparameter an Tag 0 nicht signifikant von den mit TE aufgearbeiteten Ejakulaten. Hingegen waren die in den mit CP und TE verdünnten Proben ermittelten Werte für VAP signifikant höher als die in den mit Up 1 + 2 und Up 1 verdünnten Proben, für VCL signifikant höher als in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben und für VSL signifikant höher als in den mit Up 1 verdünnten Proben (jeweils mit $p < 0,01$). Auch bei Betrachtung des Parameters ALH konnte in allen verdünnten Ejakulaten unmittelbar nach dem Verdünnen eine tendenzielle Reduktion der Mittelwerte im Vergleich mit dem Nativsperma gesehen werden; allerdings erwies sich diese nur in den mit CP ($p < 0,05$) und Up 1 + 2 ($p < 0,01$) verdünnten Ejakulaten als signifikant. Ungeachtet dessen konnten in den mit CP

und TE aufgearbeiteten Ejakulaten auch für ALH signifikant höhere Werte nachgewiesen werden als in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten (jeweils mit $p < 0,01$). Bezüglich des Parameters BCF konnte erneut in allen verdünnten Ejakulaten eine tendenzielle Reduktion der Mittelwerte unmittelbar nach der Verdünnung beobachtet werden, welche in den mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten als signifikant zu beurteilen war (jeweils mit $p < 0,01$). Die mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate untereinander zeigten für BCF jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Die Motilitätsreduktion nach Zugabe der verschiedenen Verdünner zu den Nativejakulaten ist zwar übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen (Province et al., 1984; Oettlé, 1986; Rota et al., 1995; Yildiz et al., 2000; Beccaglia et al., 2009a; Varela Junior et al., 2009), allerdings kommt es nach Meinung anderer Autoren durch die Verdünnung der Ejakulate zu keiner Beeinflussung der Motilität (Rota et al., 1997; Sirivaidyapong et al., 2001).
Nach Oettlé (1986) nimmt die Motilität durch die Verdünnung mit einem TRIS-Zitrat-Eigelb-Verdünner bereits um etwa 4 % ab und durch die anschließende Kühlung nochmals um ca. 12 %. Die Reduktion der Motilität verläuft also progressiv, wobei, relativ gesehen, nach der Kühlung mehr Schäden auftreten als nach der Verdünnung (Oettlé, 1986). Gleiche Beobachtungen konnten von Yildiz et al. (2000) gemacht werden. Hier kam es durch die Zugabe eines glycerolhaltigen TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünners zum Nativsperma zu einer geringen Reduktion der Motilität, welche sich durch die nachfolgende Kühlung deutlich verstärkte. Im Gegensatz dazu konnten Schäfer-Somi et al. (2006) feststellen, dass es durch die Verdünnung mit glycerolhaltigen TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünnern mit oder ohne Equex STM Paste zu keiner Beeinflussung der geschätzten Motilität kam. Andererseits konnte in derselben Untersuchung ein signifikanter Abfall der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit nach Verdünnung mit den gleichen Verdünnern nachgewiesen werden (Schäfer-Somi et al., 2006). Nach Rota et al. (1997) haben weder die Verdünnung mit einem glycerolhaltigen TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünner mit oder ohne Equex noch die Äquilibrierung bei 4°C einen Einfluss auf die subjektiv geschätzte Motilität und auch nach Sirivaidyapong et al. (2001) beeinflussen die Zugabe eines TRIS-Eigelb-Verdünners und die anschließende Kühlung auf 4°C die Motilität der Samenzellen nicht.

Sowohl für die subjektiv bestimmte Vorwärtsbeweglichkeit als auch für die CASA-Gesamtmotilität und die CASA-Vorwärtsbeweglichkeit konnten die stärksten Abnahmen der durchschnittlichen Motilitätswerte in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten beobachtet werden; jedoch waren die Abnahmen nicht signifikant, was den Beobachtungen von Koderle et al. (2009) entspricht. Im Gegensatz dazu kam es jedoch in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten zu einer signifikanten Reduktion der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit im Vergleich mit dem Nativsperma.

Die in allen verdünnten Ejakulaten unmittelbar nach dem Verdünnen beobachteten signifikanten Abnahmen der Mittelwerte für die Geschwindigkeitsparameter VAP, VCL und VSL sowie für den Parameter ALH waren ebenfalls in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten am stärksten ausgeprägt. Zudem konnten in den mit Up 1 + 2 verdünnten Proben signifikant niedrigere Werte für VAP, VCL und ALH gemessen werden als in den mit CP und TE verdünnten Proben.

Eine mögliche Erklärung für die (tendenziell) stärkeren Motilitätsabnahmen im Verdünner Up 1 + 2 im Vergleich zu den anderen Verdünnern ist, dass die mit Up 1 + 2 verdünnten Proben vor der Beurteilung der Motilität im Rahmen der Äquilibrierungsphase bereits auf 4°C abgekühlt worden waren, was zu Kühlschäden, verursacht durch den sog. „Kälteschock“ (Hoffmann, 2003d), geführt haben könnte, welche sich zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits in einer Motilitätsreduktion widerspiegelten. Dies ist übereinstimmend mit Weitze und Petrunkina (2007), welche die Verminderung der Motilität als einen wichtigen Effekt des Kälteschocks ansehen, und mit Oettlé (1986), nach dem durch die Kühlung relativ mehr Schäden an den Samenzellen auftreten als durch die Verdünnung.

Weiterhin kommt auch das im Verdünner Up 1 + 2 enthaltene Glycerol (5 %) als Ursache für den stärkeren Motilitätsabfall in Frage, da bekannt ist, dass Glycerol einen depressiven Effekt auf die Motilität von flüssigkonservierten Samenzellen ausübt (Günzel-Apel et al., 1993) und es daher üblicherweise nicht zur Flüssigkonservierung von Hundesperma verwendet wird (Province et al., 1984). Ein weiterer Inhaltstoff, der den Verdünner Up 1 + 2 von den anderen Verdünnern unterschied, war das Equex. In der Literatur konnten jedoch keine Berichte über einen möglichen durch Equex verursachten unmittelbaren Motilitätsabfall von flüssigkonserviertem Sperma gefunden werden. Im Gegensatz zum hier beobachteten Motilitätsabfall der mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulate unmittelbar

nach dem Verdünnen, konnten Niżański et al. (2009) sogar eine initiale Aktivierung der Motilität durch den Zusatz von Equex zum Verdünner beobachten, was in der vorliegenden Arbeit folglich nicht bestätigt werden konnte.
Ein unmittelbarer nachteiliger Effekt der Zentrifugation auf die Motilität konnte ausgeschlossen werden, da sowohl die mit Up 1 + 2 als auch die nur mit Up 1 verdünnten Ejakulate vor der Aufarbeitung zentrifugiert wurden und somit auch die Motilitätswerte der mit Up 1 verdünnten Ejakulate betroffen sein müssten. Daher können die Aussagen von Günzel (1986) und Rijsselaere et al. (2002a), dass die Zentrifugation weder auf die Gesamtmotilität noch auf die Vorwärtsbeweglichkeit einen nachteiligen Einfluss besitzt, bestätigt werden. Auch Koderle et al. (2009) konnten bei mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Motilität zwischen zentrifugierten und nicht zentrifugierten Proben finden, was ebenso gegen einen unmittelbaren Effekt durch die Zentrifugation spricht. Bei Schäfer-Somi et al. (2006) kam es durch die Zentrifugation zwar zu keiner Beeinflussung der geschätzten Motilität, jedoch war der ohnehin beobachtete signifikante Abfall der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit nach Verdünnung noch stärker ausgeprägt, wenn die Ejakulate vor der Verdünnung zentrifugiert worden waren, was in den vorliegenden Untersuchungen, zumindest an Tag 0, jedoch nicht nachgewiesen werden konnte.
Nach Rota et al. (1995) ist Seminalplasma für die Konservierung von caninem Sperma bei 4°C ungeeignet. Durch die vorliegenden Ergebnisse ließ sich jedoch kein unmittelbarer nachteiliger Effekt von Seminalplasma auf die Motilität von flüssigkonservierten Samenzellen nachweisen, da die flüssigkonservierten Ejakulate, welche nicht zentrifugiert wurden (CP, TE), teils sogar bessere Motilitätswerte zeigten als die zuvor zentrifugierten Ejakulate. Dies ist übereinstimmend mit Sirivaidyapong et al. (2001), nach denen Prostatasekret zwar die Qualität von kryokonserviertem Sperma negativ beeinflusst, nicht jedoch die Motilität von flüssigkonserviertem Sperma.
Der im Verdünner Up 1 unmittelbar nach dem Verdünnen erkennbare Anstieg der Motilität war nicht zu erwarten und konnte nur mittels CASA (Gesamtmotilität und Vorwärtsbeweglichkeit), nicht aber durch die subjektive Schätzung nachgewiesen werden. Dies könnte möglicherweise dadurch bedingt sein, dass die CASA-Messungen genauer waren, da CASA-Systeme selbst feine Veränderungen in der Spermienbewegung erkennen können (Ellington et al., 1993; Amann und Katz, 2004), welche für den menschlichen Untersucher nicht sichtbar sind. Dagegen

spricht allerdings, dass bezüglich der CASA-Motilitätsparameter VAP, VCL, VSL, ALH und BCF in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten keine Zunahmen beobachtet werden konnten. Zudem waren solch initiale Zunahmen der Vorwärtsbeweglichkeit auch bei Günzel (1986) und Tsutsui et al. (2003b) zu finden, welche ohne CASA arbeiteten. Weiterhin konnte auch bei Schäfer-Somi und Aurich (2007) verglichen mit der geschätzten Motilität der Nativejakulate eine signifikante Zunahme der CASA-Gesamtmotilität durch Zugabe von TRIS-Fruktose-Puffer gesehen werden. Ebenso ließ sich bei Niżański et al. (2009) eine initiale Zunahme fast aller durch CASA bestimmten Motilitätsparameter unmittelbar nach dem Verdünnen mit einem TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünner finden. Zur Ursache für diese initialen Motilitätssteigerungen wurden jedoch keine Angaben gemacht. Ein denkbarer Erklärungsansatz ist, dass es bedingt durch die Substratzufuhr über den Verdünner zu einer Stoffwechselsteigerung der Spermien (Schäfer et al., 1997) und somit auch zu einer Steigerung der Motilität kam. Auch nach Weitze und Petrunkina (2007) reagieren Säugersamenzellen nach Verdünnung mit einer gesteigerten Aktivität. Dagegen spricht allerdings, dass in den anderen Verdünnern eine solche Motilitätszunahme nicht zu beobachten war, obwohl auch hier Energiesubstrate enthalten waren.

Obwohl Glycerol üblicherweise nicht zur Flüssigkonservierung von Hundesperma eingesetzt wird (Province et al., 1984), schien das im Verdünner Up 1 enthaltene Glycerol (3 %) in der vorliegenden Untersuchung keinen unmittelbaren nachteiligen Effekt auf die Motilität (CASA-Gesamtmotilität, CASA-Vorwärtsbeweglichkeit) auszuüben. Dies bestätigt die Aussage von Province et al. (1984), dass der Zusatz von 3 % Glycerol keine Auswirkungen auf die Motilität besitzt. Im Gegenteil kam es im Verdünner Up 1 zu einer initialen Steigerung der CASA-Gesamtmotilität und der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit. Betrachtet man allerdings die subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit sowie die CASA-Motilitätsparameter VAP, VCL, VSL und BCF, so kam es im Verdünner Up 1 zu einer signifikanten Motilitätsreduktion gegenüber dem Nativsperma, wodurch die von Province et al. (1984) getroffene Aussage nicht mehr bestätigt werden kann. Ob jedoch das Glycerol ursächlich für die Motilitätsreduktion war, bleibt offen, zumal die subjektiv und die mittels CASA bestimmten Werte z. T. konträre Ergebnisse lieferten.

5.3.2.3 Viabilität

Unmittelbar nach der Aufarbeitung mit den verschiedenen Verdünnern zeigten weder die im Eosinausstrich bestimmte Viabilität noch die mittels CASA nach SYBR-14/PI-Färbung gemessene Viabilität signifikante Veränderungen im Vergleich zum Nativsperma und auch zwischen den verschiedenen Verdünnern untereinander konnten bezüglich beider Parameter keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Die im Eosinausstrich bestimmten Werte blieben in den Verdünnern CP, TE und Up 1 + 2 relativ konstant, während sich im Verdünner Up 1 tendenziell sogar durchschnittlich mehr lebende Samenzellen nachweisen ließen als in den Nativejakulaten. Bei Bestimmung der Viabilität mittels CASA zeigte sich im Verdünner Up 1 + 2 unmittelbar nach dem Verdünnen eine tendenzielle Reduktion und in den Verdünnern CP, TE und Up 1 tendenzielle Zunahmen gegenüber dem Nativsperma.

Diese Ergebnisse bestätigen die Aussagen von Burgess et al. (2001), nach denen die Zugabe des Verdünners (glycerolhaltiger TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner) und die Kühlung keine signifikanten unmittelbaren Effekte auf den nach Nigrosin-Eosin-Färbung ermittelten Prozentsatz an lebenden Samenzellen ausüben. Auch die Inkubation von verdünntem Sperma bei 39°C verursachte keine signifikanten Veränderungen der Anzahl an lebenden Spermien, was bedeutet, dass die Zugabe des Verdünners ebenso keinen verzögerten Effekt auf die Viabilität bewirkt. Lediglich die Inkubation nach Kühlung resultierte in einer signifikanten Abnahme des Prozentsatzes an lebenden Spermien, wodurch von einem verzögerten Effekt der Kühlung auf die Viabilität ausgegangen werden kann (Burgess et al., 2001). Auch nach Sirivaidyapong et al. (2001) beeinflussen die Zugabe von TRIS-Eigelb-Verdünner und die Kühlung auf 4°C die Viabilität der Samenzellen nicht.

Nach Koderle et al. (2009) verursachte die Zugabe von Up 1 + 2 keinen signifikanten Abfall der Viabilität der Samenzellen vor dem Einfrieren. Auch dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Zum einen scheint Prostatasekret die Viabilität von flüssigkonserviertem Sperma zwar nicht zu beeinflussen (Sirivaidyapong et al., 2001), zum anderen übt jedoch auch die Zentrifugation keinen negativen Einfluss auf die Viabilität der Samenzellen aus (Koderle et al., 2009). Dadurch, dass in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den zentrifugierten und den nicht

zentrifugierten flüssigkonservierten Ejakulaten nachgewiesen werden konnten, können für die Ergebnisse an Tag 0 auch diese Aussagen bekräftigt werden.
Das Phänomen, dass sich in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten im Eosinausstrich tendenziell mehr lebende Samenzellen nachweisen ließen als in den Nativejakulaten, konnte in ähnlicher Weise auch bei Burgess et al. (2001) gefunden werden. Hier enthielten die verdünnten Proben nach Nigrosin-Eosin-Färbung ebenfalls immer einen leicht höheren Anteil an lebenden Spermien als die Nativejakulate. Nach Ansicht der Autoren ist dies vermutlich auf eine durch Verdünnerbestandteile (insbesondere Eigelb) verursachte Agglutination der Spermien in den mit Nigrosin-Eosin gefärbten Ausstrichen zurückzuführen, da agglutinierte Spermien von der Beurteilung ausgeschlossen wurden, weil die einzelnen Spermienköpfe schwierig zu erkennen waren. Zudem neigen gerade unbewegliche und tote Samenzellen eher zu Agglutinationen (Campbell et al., 1956), was letztlich in einer Unterschätzung ihrer Anzahl resultierte (Burgess et al., 2001). Diese Theorie könnte auch die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse erklären. Weiterhin lässt sie sich auch auf die tendenziellen Zunahmen der mittels CASA nach SYBR-14/PI-Färbung gemessenen Viabilität in den Verdünnern CP, TE und Up 1 anwenden, da das SpermVision™-System agglutinierte Spermien ebenfalls automatisch von der Beurteilung ausschließt.

5.3.2.4 Pathomorphologie

Der Gesamtanteil an morphologisch veränderten Samenzellen in den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten zeigte unmittelbar nach dem Verdünnen in den Verdünnern CP und TE signifikante Unterschiede zum Nativsperma, wobei der Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen in den mit CP und TE verdünnten Ejakulaten niedriger war als im Nativsperma. Tendenziell war in allen verdünnten Ejakulaten eine Verringerung des Gesamtanteils an morphologisch veränderten Spermien im Vergleich mit dem Nativsperma zu beobachten. Zwischen den verschiedenen Verdünnern untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.
Die beobachteten Abnahmen des Gesamtanteils an morphologisch veränderten Samenzellen in den verdünnten Ejakulaten unmittelbar nach dem Verdünnen waren nicht nachvollziehbar. Gegen eine zufallsbedingte Beobachtung spricht die Tatsache, dass es in allen verdünnten Ejakulaten unabhängig vom Verdünner zu einer Verringerung des durchschnittlichen Anteils an morphologisch veränderten

Spermien kam. Möglicherweise können diese Abnahmen ebenfalls durch eine Agglutination der Spermien im Eosinausstrich erklärt werden (Burgess et al., 2001), da auch hier agglutinierte Spermien nicht zur Beurteilung herangezogen wurden. Eine andere Ursache könnte die Sedimentation von morphologisch veränderten Spermienformen in den verdünnten Proben vor der Entnahme des Spermas zur Anfertigung der Eosinausstriche und somit eine fehlerhafte Unterschätzung der morphologisch veränderten Samenzellen sein. Dagegen spricht jedoch das mehrmalige Schwenken der Gefäße vor der Entnahme des Spermas. Weiterhin ist denkbar, dass die Abnahme an morphologisch veränderten Samenzellen in den verdünnten Ejakulaten durch die Milieuverbesserung aufgrund der Verdünnerzugabe verursacht wurde. Hierfür kommt insbesondere eine Abnahme der Geißelveränderungen in Frage.

Bei getrennter Betrachtung der einzelnen auftretenden morphologischen Veränderungen waren die Anteile der entsprechenden Veränderungen in den verdünnten Ejakulaten an Tag 0 (mit Ausnahme des Anteils an schleifenförmigen Schwänzen in den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten) ebenfalls stets geringer als in den Nativejakulaten, was übereinstimmend mit den Beobachtungen für den Gesamtanteil an morphologisch veränderten Samenzellen war (siehe oben).

Die in den mit CP, TE und Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelte signifikante Verringerung des Anteils an Samenzellen mit Plasmatropfen im Vergleich mit dem Nativsperma fiel jedoch in ähnlicher Weise bereits während der Untersuchungen aller verdünnten Ejakulate auf: Während bei der Motilitätsbeurteilung unter dem Phasenkontrastmikroskop in den entsprechenden Nativejakulaten noch (viele) Spermien mit Plasmatropfen zu erkennen waren, ließen sich später im Eosinausstrich des Nativspermas sowie im Eosinausstrich des verdünnten Spermas wesentlich weniger Samenzellen mit Plasmatropfen nachweisen. Dies könnte darauf hindeuten, dass es durch das Ausstreichen und/oder die Färbung der Spermien möglicherweise zu einer Ablösung der Plasmatropfen kommen kann und somit der Anteil an Spermien mit Plasmatropfen fälschlicherweise unterschätzt wird. Ähnliche Beobachtungen konnten auch von Root Kustritz et al. (1998) gemacht werden. Nach deren Meinung können offensichtlich erkennbare Abnahmen bestimmter morphologischer Veränderungen entweder durch eine Maskierung oder durch eine Entfernung des Defektes durch

die entsprechende Technik verursacht werden. Jedoch können offensichtlich erkennbare Zunahmen bestimmter Veränderungen auch entweder durch eine Betonung oder durch eine Erzeugung des Defektes durch die entsprechende Methode bedingt sein (Root Kustritz et al., 1998).
Die in den mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten im Vergleich zum Nativsperma beobachtete Zunahme des Anteils an Samenzellen mit schleifenförmigem Schwanz könnte einerseits eventuell ein Hinweis darauf sein, dass es durch die Verdünnerzugabe bevorzugt zu eben diesen Veränderungen an den Samenzellen kommt, andererseits jedoch auch eine zufällige Beobachtung sein. Möglicherweise verursacht die Zugabe des Verdünners eine Zunahme des Anteils an Samenzellen mit schleifenförmigem Schwanz, indem sie ähnliche Reaktionen der Samenzellen auslöst, wie sie auch beim HOS-Test gesehen werden können. Dies würde bedeuten, dass die entsprechenden Verdünner nicht isoton zum Seminalplasma waren. Da die Osmolarität der Verdünner in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestimmt wurde, bleibt Letzteres ungeklärt. Für eine zufällige Beobachtung spricht die Tatsache, dass es in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten nicht zu einem Anstieg des Anteils an Samenzellen mit schleifenförmigem Schwanz kam. Zudem spiegelte sich die Zunahme des Anteils an schleifenförmigen Schwänzen auch im Gesamtanteil an morphologisch veränderten Samenzellen nicht wider, weshalb von einer untergeordneten Bedeutung auszugehen ist.
Auf Basis des Gesamtanteils an morphologisch veränderten Samenzellen kann in jedem Fall bestätigt werden, dass die Zugabe eines Verdünners keine signifikanten ultrastrukturellen Veränderungen der Samenzellen verursacht (Burgess et al., 2001). Eine mögliche Beeinflussung der Spermienmorphologie durch die Zentrifugation (WHO, 2010) konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden, da sich der Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen in zentrifugierten Proben nicht signifikant von dem in unzentrifugierten Proben unterschied.

5.3.2.5 Akrosomale Veränderungen

Vor der Gamenteninteraktion müssen die Samenzellen im weiblichen Reproduktionstrakt die Kapazitation, welche hyperaktive Motilität und die AR einschließt, durchlaufen (De los Reyes et al., 2009). Das Akrosom ist ein sekretorisches Vesikel, das etwa zwei Drittel der nukleären Oberfläche bedeckt

und zahlreiche Enzyme enthält, die dazu dienen, der Samenzelle die Penetration der ZP der Eizelle zu ermöglichen. Die Sekretion dieser Enzyme aus dem Akrosom wird als AR bezeichnet. Die AR findet nur an der Oberfläche der ZP statt. So erlangen die Spermien die Fähigkeit, diese Barriere zu durchdringen. Während der AR werden inaktive Enzymformen wie Proakrosin zur aktiven Form umgewandelt. Daher ist der Anteil an Spermien, denen Proakrosin bzw. Akrosin fehlt und/oder das Ausmaß der Proakrosinaktivierung ein akkurater Indikator für die AR. Eine prämature AR kann die Befruchtungsrate vermindern (Cortes et al., 2006). Durch Zentrifugation und Verdünnung mit einem TRIS-Eigelb-Verdünner werden weder der durchschnittliche Gehalt an Proakrosin noch die durchschnittliche Akrosinaktivität verändert. Kühlung des verdünnten Spermas führt hingegen zu einer signifikanten Reduktion des Gehaltes an Proakrosin, jedoch ohne signifikante Verminderung der Akrosinaktivität. Deshalb wird vermutet, dass die Kühlung die Autoaktivierung eines Teils des Proakrosins induziert, das so gebildete Akrosin aber im Akrosom verbleibt (Froman et al., 1984). Nach Sirivaidyapong et al. (2000) hat auch die Zusammensetzung des Verdünnungsmediums und insbesondere dessen Ca^{2+}-Konzentration einen deutlichen Einfluss auf die AR caniner Spermien; hohe Ca^{2+}-Konzentrationen fördern die AR, während niedrige sie verzögern. Das in vielen Verdünnern enthaltene Eigelb verhindert einen signifikanten Anstieg kapazitierter Samenzellen während der Flüssigkonservierung (Witte et al., 2009) und schützt die Spermien somit gegen spontane AR (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b).

Die Beurteilung des akrosomalen Status der Samenzellen erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach Spermac®-Färbung. Diese erwies sich nach Oettlé (1986) als vorteilhaft, um Veränderungen am Akrosom zu erfassen, welche während des Verarbeitungsprozesses bei der Konservierung von caninem Sperma auftreten können. Tendenziell war in den mit CP, TE und Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten eine Zunahme des Anteils an Kopfkappenveränderungen sowie des Anteils an abgelösten Akrosomen zu erkennen, während in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten beide Anteile nahezu konstant blieben. Signifikante Unterschiede der einzelnen Verdünner zum Nativsperma ließen sich nur für die Verdünner CP und TE bezüglich des Anteils an Kopfkappenveränderungen nachweisen (jeweils mit $p < 0,05$). Zwischen den verschiedenen Verdünnern untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Tendenzielle Zunahmen des Anteils an akrosomalen Veränderungen durch die Verdünnerzugabe konnten auch von Rota et al. (1995) nachgewiesen werden. Nach Burgess et al. (2001) verursacht die Zugabe eines glycerolhaltigen TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünners jedoch keine signifikanten unmittelbaren oder verzögerten ultrastrukturellen Veränderungen der Samenzellen, wohingegen die anschließende Kühlung in einem unmittelbaren Anstieg der Anzahl an transmissionselektronenmikroskopisch erkennbaren akrosomalen Veränderungen resultiert. Weitere Inkubation des zuvor gekühlten Spermas bei 39°C führt nur zu einem leichten Anstieg der akrosomalen Veränderungen (Burgess et al., 2001), was gegen einen verzögerten Effekt der Kühlung auf die akrosomale Integrität spricht. Nach Sirivaidyapong et al. (2001) wird die akrosomale Integrität weder durch die Verdünnung mit einem TRIS-Eigelb-Verdünner noch durch die Kühlung auf 4°C beeinflusst und auch Prostatasekret hat keine negativen Effekte auf das Akrosom. Dies steht im Gegensatz zu den Aussagen von Oettlé (1986), nach denen akrosomale Schäden während der Verdünnung und der Kühlung auftreten. So kommt es bereits durch die Verdünnung mit einem TRIS-Zitrat-Eigelb-Verdünner zu einer Reduktion des Anteils an Samenzellen mit normalem Akrosom um ca. 11 % und durch die Kühlung auf 5°C nochmals zu einer Verminderung um etwa 17 %. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass ein signifikanter Anteil der akrosomalen Schäden in gleichem Maße durch die Verdünnung und die Kühlung verursacht wird und nicht erst durch das Einfrieren (Oettlé, 1986).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen zum einen die Aussage, dass es bereits durch die Verdünnung zu einer Zunahme des Anteils an akrosomalen Veränderungen kommt (Oettlé, 1986), wobei allerdings eine statistische Signifikanz nur für die Verdünner CP und TE nachgewiesen werden konnte. Auf der anderen Seite kann auch die Aussage von Burgess et al. (2001) bestätigt werden, da der Anteil an akrosomalen Veränderungen durch die Verdünnung mit Up 1 nahezu unverändert blieb. Der tendenziell stärkste Anstieg an akrosomalen Veränderungen wurde im Verdünner Up 1 + 2 nachgewiesen, auch wenn dieser sich als nicht signifikant erwies. Möglicherweise könnte dies durch die bereits erfolgte Kühlung auf 4°C bedingt sein, wodurch die in der Literatur gefundenen Aussagen von Burgess et al. (2001) und Oettlé (1986) bezüglich des Einflusses der Kühlung auf die akrosomale Integrität untermauert werden könnten.

Dass die Zentrifugation keinen nachteiligen Effekt auf den Anteil an akrosomintakten Samenzellen hat (Günzel, 1986), konnte durch die vorliegenden

Ergebnisse bestätigt werden, da der Anteil an akrosomalen Veränderungen in den zentrifugierten Proben im Vergleich zum Nativsperma nicht signifikant anstieg und auch zwischen zentrifugierten und nicht zentrifugierten Ejakulaten kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte. Allerdings kann ebenso ein negativer Einfluss von Prostatasekret auf die akrosomale Integrität nicht ausgeschlossen werden, da gerade die nicht zentrifugierten und somit Prostatasekret enthaltenden Proben (CP, TE) verglichen mit dem Nativsperma signifikante Zunahmen des Anteils an akrosomalen Veränderungen zeigten.

5.3.2.6 Funktionelle Integrität der Plasmamembran

Die Untersuchung der funktionellen Integrität der Plasmamembran erfolgte mithilfe des HOS-Tests. Dabei kam es in allen verdünnten Ejakulaten im Vergleich zu den Nativejakulaten zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an Samenzellen mit nicht-intakten bzw. biochemisch nicht-aktiven Membranen (CP, TE, Up 1 + 2 mit $p < 0{,}01$; Up 1 mit $p < 0{,}05$). Dies ist übereinstimmend mit Rota et al. (1995), bei deren Untersuchungen es durch die Zugabe verschiedener Verdünner ebenfalls zu einer tendenziellen Zunahme des Anteils an Samenzellen mit nicht-intakter Plasmamembran kam, wenn auch dieser nicht als signifikant zu beurteilen war. Der geringste Anstieg war in mit Up 1 verdünnten Ejakulaten zu beobachten, der stärkste in mit Up 1 + 2 verdünnten Proben, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verdünnern untereinander ermittelt werden. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass es bereits durch die Verdünnung an sich zu einer Beeinflussung der funktionellen Merkmale der Samenzellen kommt und nicht erst durch die nachfolgende Kühlung. In jedem Fall wurden die Membranen bereits durch die Verdünnung geschädigt oder inaktiviert. Allerdings muss beachtet werden, dass die mit Up 1 + 2 verdünnten Proben, welche den stärksten Anstieg des Anteils an Samenzellen mit nicht aufgerolltem Schwanz zeigten, zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits für eine Stunde bei 4°C gekühlt worden waren. Dadurch lässt sich eine kühlungsbedingte Verstärkung des durch die Verdünnung entstandenen Effektes nicht ausschließen. Des Weiteren muss auch die Zusammensetzung der Verdünner Berücksichtigung finden. Möglicherweise ist ein Zusammenhang zwischen dem in Up 1 + 2 enthaltenen Glycerol oder dem Equex und dem stärkeren Anstieg in den entsprechenden Proben vorhanden. Gegen Glycerol als verantwortliche Substanz spricht allerdings die Tatsache, dass in Up 1 auch Glycerol enthalten ist und in den mit Up 1

verdünnten Proben der geringste Anstieg zu beobachten war. Jedoch ist in Up 1 die Glycerolkonzentration wesentlich geringer.

Die vorliegenden Ergebnisse widersprechen den von Kumi-Diaka und Badtram (1994) gemachten Beobachtungen, dass die Verdünnung mit TRIS-Dextrose-Eigelb-Verdünner und die anschließende Flüssigkonservierung bei 5°C für 24 Stunden die physikalischen und funktionellen Eigenschaften caniner Spermien nicht signifikant beeinflussen. Bereits ohne Kühlung kam es bei den vorliegenden Untersuchungen schon zu signifikanten Zunahmen des Anteils an Samenzellen mit nicht-intakten Membranen. Möglicherweise waren jedoch auch methodische Unterschiede für diese konträren Ergebnisse verantwortlich. Zum einen setzten Kumi-Diaka und Badtram (1994) einen anderen Verdünner ein und zum anderen besaß auch die verwendete hypoosmotische Lösung eine andere Osmolarität und die für den Test eingesetzte Spermamenge sowie die Inkubationszeit unterschieden sich.

Interessant wäre gewesen, den HOS-Test zu ausgewählten Zeitpunkten während des Zeitraums der Flüssigkonservierung bei 4°C zu wiederholen, da nach Kumi-Diaka (1993) die Spermakonservierung die Reaktion der Samenzellen auf den HOS-Test nachteilig beeinflusst. Während der Lagerung in ICG-Verdünner (International Canine Genetics) bei 5°C für 72 Stunden konnte eine kontinuierliche, signifikante Abnahme des Anteils an Samenzellen mit aufgerollter Geißel im HOS-Test nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die Lagerung bei 5°C Schäden der Spermienmembran verursacht, welche zur Folge haben, dass die Samenzellen ihre Fähigkeit, mit einer Aufrollung der Geißel auf die hypoosmotische Lösung zu reagieren, verlieren (Kumi-Diaka, 1993). Tendenzen zur Unterstützung dieser These konnten in der vorliegenden Arbeit bereits an Tag 0 gesehen werden, da die mit Up 1 + 2 verdünnten Proben, welche den stärksten Anstieg des Anteils an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel zeigten, zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits für eine Stunde bei 4°C gekühlt worden waren.

5.3.3 Ergebnisse der Halteproben im Zeitverlauf

Die Flüssigkonservierung caniner Ejakulate führt nicht zur Verbesserung der Spermaqualität, sondern es wird lediglich über einen zu definierenden Zeitraum die Ausgangsqualität aufrechterhalten (Kumi-Diaka und Badtram, 1994). Unumstritten ist, dass die Spermaqualität bei Flüssigkonservierung bei 4 bzw. 5°C

im Zeitverlauf stetig abnimmt (England und Ponzio, 1996; Ponglowhapan et al., 2004; Michael et al., 2008; 2009), wie es auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Parallel zur Qualitätsreduktion der flüssigkonservierten Ejakulate kommt es zu einem Anstieg des Anteils an ROS, was vermuten lässt, dass dies in kausalem Zusammenhang zur Verminderung der caninen Spermaqualität steht (Michael et al., 2009).
Bei gesonderter Betrachtung der flüssigkonservierten Proben des Rüden Nr. 20, dessen Ejakulat eine geringe Blutbeimengung aufwies, war im Vergleich zu den übrigen Proben keine Tendenz für eine zusätzliche nachteilige Beeinflussung der Spermaqualität durch Blut zu erkennen. Dies bekräftigt die bei Rijsselaere et al. (2004b) gefundene Aussage, dass Blutbeimengungen ≤ 10 Vol. % keine negativen Effekte auf die funktionellen Charakteristika von bei 4°C flüssigkonservierten caninen Spermien ausüben. Während Rijsselaere et al. (2004b) dies für eine Lagerungsdauer von vier Tagen nachweisen konnten, waren in der vorliegenden Arbeit auch über zehn Tage keine Tendenzen für negative Effekte durch die Blutbeimengung festzustellen. Es ist davon auszugehen, dass Blut im Ejakulat die Befruchtungsfähigkeit caniner Spermien nicht beeinflusst (Linde-Forsberg, 1995).

5.3.3.1 Motilität

Obwohl die Motilität nur eine von vielen wichtigen Eigenschaften eines fertilen Spermiums darstellt, ist sie der am häufigsten genutzte Indikator für eine normale Spermienfunktion (Peña Martínez, 2004) und auch einer der wichtigsten Parameter für die Beurteilung der Spermaqualität (Rigau et al., 2001). Motilität ist ein Ausdruck für die strukturelle und funktionelle Kompetenz (Peña Martínez, 2004) sowie für die Viabilität der Samenzellen (Verstegen et al., 2002). Aufgrund der Tatsache, dass die Motilität nicht immer gut mit der akrosomalen Integrität korreliert, sind jedoch weitere Untersuchungsparameter zur Beurteilung der Spermaqualität nötig (Oettlé, 1986).

Verglichen mit der Untersuchung unmittelbar nach dem Verdünnen ließ sich in den Verdünnern CP, TE und Up 1 sowohl bei subjektiver Beurteilung als auch bei Messung mittels CASA nach 24 Stunden ein tendenzieller Anstieg der Motilität nachweisen. Die im Vergleich zu Tag 0 höheren Motilitätswerte konnten in den verschiedenen Verdünnern für mindestens einen Tag (CP, TE, Up 1) und für längstens fünf Tage (CASA-Gesamtmotilität und CASA-Motilitätsparameter DCL

und VCL im Verdünner CP, CASA-Motilitätsparameter DCL und VCL im Verdünner TE) aufrechterhalten werden. Eine tendenzielle Motilitätssteigerung 24 Stunden nach Verdünnerzugabe über ca. zwei Tage konnte auch bei Verstegen et al. (2005) beobachtet werden. Möglicherweise bewirkte die Substratzufuhr durch die Verdünner eine Stoffwechselsteigerung der Spermien (Schäfer et al., 1997) und somit eine Steigerung der Motilität. Auch nach Weitze und Petrunkina (2007) reagieren Säugersamenzellen nach Verdünnung mit einer gesteigerten Aktivität. Eine hohe Stoffwechselaktivität der Samenzellen während der ersten 24 Stunden der Lagerung und somit ein erhöhter Glukoseverbrauch wird auch von Verstegen et al. (2005) als Grund für den von ihnen beobachteten raschen initialen Abfall der Glukosekonzentration in den flüssigkonservierten Ejakulaten angesehen. Ebenso konnten Ponglowhapan et al. (2004) im ersten Zeitabschnitt der Flüssigkonservierung (Tag 1 bis 3) einen signifikant höheren Zuckerverbrauch ermitteln als in den folgenden Zeitabschnitten. Die mittleren Werte für VAP, VSL und VCL stiegen dabei im Vergleich zum gepoolten Nativsperma in den ersten drei Tagen nach der Verdünnung und Kühlung signifikant an, was darauf hindeutet, dass Zuckerzusätze in Verdünnern die Spermiengeschwindigkeit anregen (Ponglowhapan et al., 2004). Zwar konnte in der vorliegenden Arbeit verglichen mit dem Nativsperma kein unmittelbarer Anstieg der durchschnittlichen Spermiengeschwindigkeiten beobachtet werden, dafür jedoch nach 24 Stunden für die Parameter VAP (im Verdünner TE) und VCL (in den Verdünnern CP, TE und Up 1). Der durch die Stoffwechselsteigerung erhöhte Verbrauch an Sauerstoff, Nährstoffen und Energie sowie die Anhäufung von Laktat und das Absinken des pH-Wertes könnten dann den sich anschließenden Motilitätsabfall verursachen (Schäfer et al., 1997). Im Verdünner Up 1 + 2 konnte trotz Substratzufuhr keine Zunahme der Motilität beobachtet werden. Ursächlich hierfür könnte die im Vergleich zu Up 1 höhere Glycerolkonzentration des Verdünners sein, da bekannt ist, dass Glycerol einen depressiven Effekt auf die Motilität von flüssigkonservierten Samenzellen ausübt (Günzel-Apel et al., 1993).

Nach Rijsselaere et al. (2004b) induziert eine viertägige Flüssigkonservierung bei 4°C keine signifikante Reduktion der Gesamtmotilität oder der Vorwärtsbeweglichkeit und auch nach Verstegen et al. (2005) unterscheiden sich die Gesamtmotilität und die Vorwärtsbeweglichkeit in mit TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünner flüssigkonservierten Ejakulaten während der ersten zehn

(Gesamtmotilität) bzw. fünf Tage (Vorwärtsbeweglichkeit) der Lagerung nicht signifikant von den initialen Motilitätswerten. Im Gegensatz dazu kam es in der eigenen Arbeit in allen verdünnten Ejakulaten während der Flüssigkonservierung bei 4°C über zehn Tage zu einer signifikanten Reduktion der Motilität ($p < 0{,}0001$), was sowohl mit den Methoden der klassischen Spermatologie als auch mittels CASA verifiziert werden konnte. Auch für die mittels CASA bestimmten Streckenparameter DAP, DCL und DSL, für die Geschwindigkeitsparameter VAP, VCL und VSL sowie für den Parameter ALH ließen sich im Zeitverlauf in allen verdünnten Ejakulaten signifikante Abnahmen nachweisen. Bezüglich des Parameters BCF konnten in allen verdünnten Ejakulaten tendenzielle Abnahmen beobachtet werden, welche jedoch nur in den mit Up 1 + 2 und Up 1 verdünnten Ejakulaten als signifikant zu beurteilen waren. Die Parameter LIN und WOB ließen im Zeitverlauf in den mit CP, TE und Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten signifikante Abnahmen erkennen. Lediglich für den Parameter STR waren über den Untersuchungszeitraum keine signifikanten Veränderungen nachweisbar. Eine Motilitätsabnahme war zu erwarten und wurde für Lagerungszeiträume von 2 bis 23 Tagen bereits von verschiedenen anderen Autoren gezeigt (Foote und Leonard, 1964; Province et al., 1984; Günzel, 1986; Bouchard et al., 1990; Kumi-Diaka, 1993; Rota et al., 1995; England und Ponzio, 1996; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Rijsselaere et al., 2002a; Tsutsui et al., 2003b; Ponglowhapan et al., 2004; Niżański und Klimowicz, 2005; Verstegen et al., 2005; Hermansson und Linde-Forsberg, 2006; Hermansson et al., 2006; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007; Beccaglia et al., 2009a; Niżański et al., 2009; Michael et al., 2009; 2010; Kmenta et al., 2011). Die Verminderung der Motilität ist ein wichtiger Effekt des Kälteschocks (Weitze und Petrunkina, 2007). Nach Ponglowhapan et al. (2004) könnte sie durch verschiedene Subpopulationen unter den Samenzellen mit unterschiedlich ausgeprägter Sensitivität für Umgebungsveränderungen, insbesondere für reduzierte Temperaturen, verursacht werden.

Das Ausmaß der Motilitätsreduktion variiert allerdings zwischen den verschiedenen Literaturquellen: Während einige Autoren nach drei Tagen Flüssigkonservierung in TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünnern bereits Motilitäts-abnahmen auf etwa 20 % (Province et al., 1984) bzw. etwa 40-55 % (Michael et al., 2009; 2010) der Ausgangswerte beobachten konnten, waren ähnliche Motilitätsreduktionen bei Tsutsui et al. (2003b) und Niżański et al. (2009) erst nach zehn Tagen in TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünnern nachweisbar. Demgegenüber

stehen Publikationen, in denen nach zehn Tagen Lagerungsdauer bei 4 bzw. 5°C in TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünnern noch annähernd 80-90 % der Initialmotilität festgestellt werden konnten (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007). Während dann bei Iguer-Ouada und Verstegen (2001b) an Tag 15 schließlich nur noch etwa 17 % und bei Verstegen et al. (2005) sogar nur noch circa 3 % der Ausgangsmotilität nachgewiesen werden konnten, waren bei Ponglowhapan et al. (2004) zum gleichen Zeitpunkt immer noch rund 50 % und bei Shahiduzzaman und Linde-Forsberg (2007) sogar noch etwa 75 % der Initialmotilität zu beobachten. Erst nach 23 Tagen Lagerungsdauer war die Gesamtmotilität auf etwa 23 % (Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007) bzw. circa 2 % (Ponglowhapan et al., 2004) des Ausgangswertes abgesunken.
Diese Variationen der Motilitätsraten können durch verschieden Faktoren bedingt sein: 1) Unterschiedliche Ausgangsmotilität in den Nativejakulaten; 2) Unterschiedliche Verdünnerzusammensetzung; 3) Unterschiede bezüglich der Konservierungstechnik (Kühlungsrate, Entfernung von Prostatasekret, Spermienkonzentration); 4) Unterschiedliche Methoden zur Motilitätsbeurteilung (subjektiv oder objektiv) (Ponglowhapan et al., 2004). Zudem ist bei einigen Publikationen nicht deutlich erkennbar, ob eine Anwärmung der flüssigkonservierten Ejakulate vor der Motilitätsbeurteilung, wie sie von Linde-Forsberg (1991) empfohlen wird und wie sie auch in der vorliegenden Arbeit erfolgte, durchgeführt wurde.
In den eigenen Untersuchungen war das Ausmaß der Motilitätsreduktion (gemittelt über die subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit, die CASA-Gesamtmotilität und die CASA-Vorwärtsbeweglichkeit) je nach Verdünner unterschiedlich ausgeprägt: An Tag 3 konnte in den mit CP verdünnten Ejakulaten eine Abnahme auf durchschnittlich 96 %, in den mit TE verdünnten Ejakulaten auf durchschnittlich 94 %, in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten auf rund 60 % und in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten auf durchschnittlich 93 % der Ausgangsmotilität nachgewiesen werden. An Tag 10 betrug die Motilität in den mit CP verdünnten Ejakulaten noch rund 77 %, in den mit TE verdünnten Ejakulaten noch durchschnittlich 68 %, in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten noch etwa 8 % und in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten noch durchschnittlich 24 % des Initialwertes. Insgesamt war somit die Konservierung der Motilität an Tag 3 in den Verdünnern CP, TE und Up 1 als gut zu bewerten. Lediglich im Verdünner Up 1 + 2

kam es, verglichen mit der Ausgangsmotilität, schon nach drei Tagen Lagerung zu einer deutlichen Reduktion der Motilität. An Tag 10 lieferten nur noch die Verdünner CP und TE zufriedenstellende Werte, während demgegenüber die Konservierung der Motilität in den Verdünnern Up 1 + 2 und Up 1 wesentlich schlechter war.

Die hinsichtlich der Motilitätskonservierung ermittelten Ergebnisse machen deutlich, warum nach zwölf Probanden der Versuchsplan geändert und der Verdünner Up 1 + 2 durch den Verdünner Up 1 ersetzt wurde. Der Verdünner Up 1 + 2 lieferte nur für die ersten 24 Stunden der Flüssigkonservierung zufriedenstellende Konservierungsergebnisse. Danach kam es zu einem drastischen Motilitätsabfall, wie er in ähnlicher Weise von Niżański et al. (2009) in einem TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünner mit 1 % Equex, jedoch ohne Glycerol, beobachtet wurde: Nach einer initialen Aktivierung kam es nach 96 Stunden zu einem schnellen Abfall der Motilität, was die Autoren auf den Zusatz von Equex zurückführen. Die initiale Aktivierung der Motilität konnte in der vorliegenden Untersuchung bei mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten zwar nicht festgestellt werden, dafür aber der drastische Motilitätsabfall, allerdings bereits nach 48 Stunden. Möglicherweise führte insbesondere der Zusatz von Glycerol, wie in ähnlicher Weise auch von Günzel-Apel et al. (1993) beschrieben, zum früheren Motilitätsabfall in den eigenen Untersuchungen. Unabhängig vom Glycerol bestätigte sich, dass die Zugabe von Equex zu Verdünnern für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma ungeeignet ist (Niżański et al., 2009).

Die von Niżański et al. (2009) durch den Equex-Zusatz beobachteten Veränderungen der Motilitätsparameter in Richtung einer Hyperaktivierung (signifikante Erhöhung von VAP, VCL, VSL und ALH in den ersten drei Tagen der Flüssigkonservierung bei gleichzeitiger Verminderung von LIN) konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Gegenteil kam es in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten ab Tag 0 zu einer kontinuierlichen Abnahme aller Geschwindigkeitsparameter, während die Parameter ALH und LIN sich nur geringfügig veränderten.

Die Hyperaktivierung tritt physiologischerweise während des Prozesses der Kapazitation im weiblichen Eileiter auf (Rota et al., 1999b; Niżański et al., 2009) und wird als eine kräftige, nicht progressive und nicht lineare Spermienbewegung beschrieben (Verstegen et al., 2002). Während der Hyperaktivierung kommt es zu drastischen Veränderungen des Bewegungsmusters der Spermien, welches dann

durch eine große Amplitude der lateralen Bewegungen des Kopfes und des Schwanzes verbunden mit einer langsamen oder nicht progressiven Motilität sowie einem Flagellenschlag mit niedriger Frequenz charakterisiert ist (Verstegen et al., 2002). Im Allgemeinen werden signifikante Zunahmen der Parameter VCL und ALH sowie eine gleichzeitige Abnahme des Parameters LIN im Vergleich mit den initialen Werten als bezeichnend für die Hyperaktivierung angesehen (Rota et al., 1999b; Verstegen et al., 2002; Peña Martínez, 2004). Rota et al. (1999b) konnten in flüssigkonservierten Ejakulaten anhand von Chlortetracyclinfärbung und Analyse der Bewegungsmuster der Samenzellen kapazitationsartige Veränderungen nachweisen, was darauf hindeutet, dass die Flüssigkonservierung kapazitationsartige Veränderungen initiiert und beschleunigt. Eine Hyperaktivierung in vitro resultiert wahrscheinlich in einer Erschöpfung der Energiereserven der Spermien, Akkumulation von Metaboliten im Verdünner und folgendem Zelltod (Niżański et al., 2009). Auf Basis der SpermVision™-Kriterien zur Klassifizierung als hyperaktive Samenzellen (VCL > 118 µm/s, ALH > 6,5 µm und LIN < 0,5) sowie nach den von Verstegen et al. (2002) genannten Kennzeichen für eine Hyperaktivierung (VCL ≥ 70 µm/s, ALH > 7 µm und niedrige LIN) ergaben sich in der vorliegenden Arbeit in den mit den verschiedenen Verdünner aufgearbeiteten Ejakulaten jedoch zu keinem Zeitpunkt Hinweise auf ein hyperaktives Motilitätsmuster.

Die in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten bestimmten Motilitätswerte waren zu Beginn des Untersuchungszeitraums gut und auch besser als die in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten, jedoch zeigte sich hier ab Tag 5 ebenfalls ein drastischer Motilitätsabfall, sodass die Konservierungsergebnisse von Tag 5 an nicht mehr zufriedenstellend waren. Die anfangs gute Motilität in den mit Up 1 flüssigkonservierten Ejakulaten entspricht den Beobachtungen von Hermansson et al. (2006). Als Ursache für den anschließenden Motilitätsabfall kommen sowohl - wie bereits zuvor diskutiert - das im Verdünner enthaltene Glycerol (3 %) als auch die Zentrifugation der Proben in Frage. Allerdings übt der Zusatz von 3 % Glycerol zum Verdünner nach Province et al. (1984) keinen Einfluss auf die Motilität aus. Die Aussagen zum Einfluss der Zentrifugation reichen von „keine ungünstige Auswirkung“ (Günzel, 1986) bzw. „keine Beeinflussung“ (Rijsselaere et al., 2002a) bis „motilitätsreduzierend“ (Schäfer-Somi et al., 2006). Während Koderle et al. (2009) bei verdünnten Ejakulaten vor dem Einfrieren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Motilität zwischen zentrifugierten und

nicht zentrifugierten Proben finden konnten, wiesen sie jedoch nach dem Auftauen eine signifikant stärkere Motilitätsreduktion infolge der Zentrifugation nach. Aufgrund dessen lassen sich auch bei der Flüssigkonservierung verzögerte Effekte der Zentrifugation auf die Motilität nicht ausschließen. Ursachen für den nachteiligen Einfluss der Zentrifugation auf die Spermaqualität nach dem Auftauen könnten die mit der Zentrifugation einhergehende Entfernung von protektiven Seminalplasmaproteinen aus den Ejakulaten oder mechanische Schädigungen durch die Zentrifugationskraft an sich sein (Koderle et al., 2009). In dieser Arbeit waren nicht zentrifugierte Ejakulate den Proben nach Zentrifugation überlegen. Letztlich blieb jedoch unbeantwortet, ob und inwieweit das Glycerol, die Zentrifugation oder andere unbekannte Faktoren für den beobachteten Motilitätsabfall verantwortlich waren. Allerdings konnte durch die Überlegenheit der nicht zentrifugierten Ejakulate bestätigt werden, dass Prostatasekret(beimengungen) die Motilität von flüssigkonserviertem Sperma nicht negativ beeinflussen (Sirivaidyapong et al., 2001).

Während an Tag 0 der Verdünner Up 1 bezüglich der CASA-Gesamtmotilität und der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit dem Verdünner CP noch signifikant überlegen war und die Verdünner CP und TE lediglich bezüglich der CASA-Motilitätsparameter signifikant bessere Werte lieferten (siehe Kap. 5.3.2.2), so änderte sich dies im weiteren Zeitverlauf deutlich. Insgesamt wurde die Motilität über den gesamten Untersuchungszeitraum in den mit CP verdünnten Ejakulaten am besten konserviert, was im Vergleich mit den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten für die subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit, die CASA-Gesamtmotilität, die CASA-Vorwärtsbeweglichkeit und verschiedene CASA-Motilitätsparameter (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, ALH, BCF), im Vergleich mit den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten für die subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit, die CASA-Gesamtmotilität, die CASA-Vorwärts-beweglichkeit und verschiedene CASA-Motilitätsparameter (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB) und im Vergleich mit den mit TE verdünnten Ejakulaten für die subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit, die CASA-Vorwärtsbeweglichkeit sowie die CASA-Motilitätsparameter DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, BCF und LIN auch statistisch signifikant belegt werden konnte. Weiterhin zeigte sich jedoch auch in den mit TE verdünnten Ejakulaten eine gute Konservierung der Motilität, welche ebenfalls im Vergleich mit den mit Up 1 + 2

verdünnten Ejakulaten für die subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit, die CASA-Gesamtmotilität, die CASA-Vorwärtsbeweglichkeit sowie verschiedene CASA-Motilitätsparameter (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, ALH, BCF) und im Vergleich mit den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten für die subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit, die CASA-Gesamtmotilität, die CASA-Vorwärtsbeweglichkeit sowie verschiedene CASA-Motilitätsparameter (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, ALH, STR, LIN, WOB) signifikant besser war.

Ein Unterschied zwischen den Verdünnern CP und TE, der möglicherweise für die bessere Konservierung der Motilität in den mit CP verdünnten Ejakulaten verantwortlich war, könnte die im Verdünner CP zusätzlich zur Fruktose enthaltene Glukose sein. Allerdings wird nach Rigau et al. (2001) in frischem Sperma durch die Zuckerkomponente lediglich das Bewegungsmuster der Samenzellen beeinflusst, während der Prozentsatz an motilen Spermien weder durch Fruktose noch durch Glukose verändert wird. Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von Iguer-Ouada und Verstegen (2001b), welche beim Vergleich von TRIS-Fruktose-Eigelb- und TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünner signifikant bessere Motilitätsergebnisse für den TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünner feststellen konnten. Die Autoren vermuten, dass die bessere Erhaltung der Motilität im TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünner durch das Energiesubstrat (Glukose anstelle von Fruktose) bedingt war, da dies den einzigen Unterschied zwischen den Verdünnern darstellte. Die Ergebnisse deuten möglicherweise auf eine Präferenz von Hundespermien, Glukose anstelle von Fruktose zu metabolisieren, hin (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b). Letzteres konnte auch von Ponglowhapan et al. (2004) beobachtet werden. Ein denkbarer Erklärungsansatz für die Glukosepräferenz ist die höhere Kapazität des Glukosetransportsystems (Ponglowhapan et al., 2004). Im Gegensatz zu Iguer-Ouada und Verstegen (2001b) ermittelten Ponglowhapan et al. (2004) dennoch in fruktosehaltigen TRIS-Eigelb-Verdünnern höhere Gesamtmotilitätswerte als in glukosehaltigen oder in Fruktose und Glukose enthaltenden TRIS-Eigelb-Verdünnern. Da in der vorliegenden Arbeit der Glukose und Fruktose enthaltende Verdünner CP signifikant bessere Ergebnisse lieferte als der fruktosehaltige Verdünner TE, können die Beobachtungen von Ponglowhapan et al. (2004) nicht bestätigt werden. Da im Verdünner CP jedoch auch herstellereigene, unbekannte Bestandteile enthalten waren, könnten auch diese ursächlich zum besseren Erhalt der Motilität beigetragen haben.

Einen weiteren Unterschied zwischen den Verdünnern CP und TE, der eventuell als ursächlich für die bessere Konservierung der Motilität in den mit CP verdünnten Ejakulaten in Betracht zu ziehen ist, stellt der Antibiotikazusatz (Gentamicin) im Verdünner CP dar. Aurich und Spergser (2007) konnten zum einen zeigen, dass bestimmte Bakterien gemessen an Motilität, Spermiengeschwindigkeit und Membranintegrität schädliche Effekte auf die Qualität von flüssigkonserviertem Hengstsperma ausüben können. Diese Effekte wurden durch den Zusatz von Gentamicin nicht reduziert. Zum anderen wurde jedoch auch durch Gentamicin die Spermienfunktion in flüssigkonserviertem Sperma negativ beeinflusst (Aurich und Spergser, 2007). Untersuchungen, ob diese Beobachtungen auch für canines Sperma zutreffend sind, konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Trotzdem können sowohl negative bakterielle Effekte als auch negative Effekte durch den Antibiotikazusatz auf flüssigkonserviertes Hundesperma nicht ausgeschlossen werden. Es ist denkbar, dass es in der vorliegenden Arbeit in den verdünnten Ejakulaten ohne Antibiotikazusatz (TE, Up 1, Up 1 + 2) zu einer Vermehrung von eventuell enthaltenen Bakterien kam, welche zur Verminderung der Spermaqualität im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung beigetragen hat und dass eben diese Vermehrung in den mit CP verdünnten Ejakulaten durch das Gentamicin gehemmt wurde, was die bessere Konservierung der Motilität erklären könnte. Letztlich können über die Wirksamkeit von Gentamicin gegen schädliche bakterielle Effekte jedoch keine Aussagen gemacht werden, da keine mikrobiologischen Untersuchungen der Ejakulate erfolgten. Eine negative Beeinflussung der Spermienfunktion durch Gentamicin (Aurich und Spergser, 2007) konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht beobachtet werden; die Gentamicinkonzentration im Verdünner CP war allerdings unbekannt. Ebenso konnte anhand der mit TE verdünnten Ejakulate jedoch gezeigt werden, dass eine akzeptable Spermaqualität über einen längeren Zeitraum auch ohne den Einsatz von Antibiotika aufrecht erhalten werden kann.

5.3.3.2 Viabilität

Nach Burgess et al. (2001) hat die Zugabe von TRIS-basierten Verdünnern zu den Ejakulaten keine unmittelbaren oder verzögerten signifikanten Effekte auf den Anteil an lebenden Samenzellen. Auch die anschließende Kühlung übt keinen unmittelbaren signifikanten Effekt auf diesen Anteil aus, jedoch kann von einem

verzögerten negativen Effekt der Kühlung auf den Anteil an lebenden Samenzellen ausgegangen werden (Burgess et al., 2001).

In der vorliegenden Untersuchung kam es in allen verdünnten Ejakulaten während der Flüssigkonservierung bei 4°C über zehn Tage zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität ($p < 0,0001$), was sowohl mit den Methoden der klassischen Spermatologie als auch mittels CASA verifiziert werden konnte. Eine Reduktion der Viabilität war absehbar und wurde für Lagerungszeiträume von 2 bis 23 Tagen bereits von verschiedenen anderen Autoren nachgewiesen (Rota et al., 1995; England und Ponzio, 1996; Rijsselaere et al., 2002a; Tsutsui et al., 2003b; Ponglowhapan et al., 2004; Niżański und Klimowicz, 2005; Hermansson et al., 2006; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007; Michael et al., 2009; 2010; Kmenta et al., 2011).

An Tag 0 konnten hinsichtlich der Viabilität keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten ermittelt werden (siehe Kap. 5.3.2.3). Demgegenüber war der Anteil an lebenden Samenzellen im Eosinausstrich in den mit Up 1 aufgearbeiteten Ejakulaten über den gesamten Untersuchungszeitraum jedoch signifikant höher als in den mit den anderen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulaten. Die mit CP, TE und Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulate unterschieden sich bezüglich des Anteils an lebenden Samenzellen nicht signifikant voneinander. Auch bei Betrachtung der CASA-Viabilität waren die mit Up 1 verdünnten Ejakulate den mit CP verdünnten Ejakulaten im Zeitverlauf signifikant überlegen, nicht jedoch den mit TE verdünnten Ejakulaten. Die mit CP und die mit TE verdünnten Ejakulate unterschieden sich bezüglich der CASA-Viabilität nicht signifikant voneinander, zeigten aber beide über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant höhere Messwerte für die CASA-Viabilität als die mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulate.

Auf Basis dieser Ergebnisse war bezüglich der Erhaltung der Viabilität in den flüssigkonservierten Ejakulaten der Verdünner Up 1 als bester unter den getesteten Verdünnern zu beurteilen. Jedoch konnten auch mit den Verdünnern CP und TE gute Ergebnisse erzielt werden. Lediglich der Verdünner Up 1 + 2 lieferte Ergebnisse, die, im Vergleich zu denen der anderen Verdünner, als nicht zufriedenstellend anzusehen waren, worin ebenfalls die erfolgte Änderung des Versuchsplans (Ersatz von Up 1 + 2 durch Up 1) begründet lag. Ein negativer Einfluss der Zentrifugation auf die Viabilität der Samenzellen konnte in diesem Zusammenhang ausgeschlossen werden. In Übereinstimmung mit den vorherigen

Aussagen erwies sich der Zusatz von Glycerol (5 %) und Equex im Verdünner Up 1 + 2 erneut als nachteilig. Dies bestätigt die Aussage von Foote und Leonard (1964), nach denen die Überlebensrate der Spermien in Verdünnern, die Glycerol enthalten, etwas geringer ist und die von Niżański et al. (2009), dass der Zusatz von Equex die Lebensdauer der Spermien bei Inkubation bei 5°C verkürzt.
Grundsätzlich war zu beobachten, dass die Viabilität der Samenzellen über den gesamten Zeitverlauf deutlich höher war als deren Motilität. Insbesondere gegen Ende des Untersuchungszeitraumes wurde die Diskrepanz immer größer. Dies ist jedoch übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Autoren. Beispielsweise konnten Kmenta et al. (2011) nach acht Tagen Flüssigkonservierung bei 4°C in einem TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner eine CASA-Viabilität (nach SYBR-14/PI-Färbung) von 76,0 ± 13,5 % ermitteln, während die CASA-Vorwärtsbeweglichkeit nur noch etwa 38 % betrug. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass unbewegliche Samenzellen nicht zwangsläufig auch tot sind. Dass eine Reaktivierung der Motilität von offensichtlich unbeweglichen Spermien durch Zusatz von frischem Verdünner möglich ist, konnte bereits von Verstegen et al. (2005) gezeigt werden. Inwieweit es im weiblichen Reproduktionstrakt zu einer Reaktivierung der Motilität kommen kann, ist jedoch unklar.

5.3.3.3 Pathomorphologie

Die Morphologie der Samenzellen, welche teilweise durch die Motilität ausgedrückt wird und direkt mit den physiologischen Vorgängen während der Befruchtung in Zusammenhang steht, ist folgerichtig auch mit dem Reproduktionsergebnis direkt korreliert (Verstegen et al., 2002), was die Bedeutung ihrer Beurteilung erklärt.
Nach England und Ponzio (1996) ist die Morphologie der Samenzellen der Qualitätsparameter, der sich bei Flüssigkonservierung am schnellsten verschlechtert. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Während unmittelbar nach der Aufarbeitung mit den verschiedenen Verdünnern in allen verdünnten Ejakulaten eine tendenzielle bzw. in den mit CP und TE verdünnten Ejakulaten sogar eine signifikante Verringerung des Gesamtanteils an morphologisch veränderten Spermien im Vergleich mit dem Nativsperma zu beobachten war (siehe Kap. 5.3.2.4), kam es über den gesamten Untersuchungszeitraum gesehen dennoch in fast allen verdünnten Ejakulaten zu einer signifikanten Zunahme des Gesamtanteils an morphologisch veränderten

Samenzellen im Eosinausstrich ($p_{Zeit} = 0{,}0007$ bis $< 0{,}0001$). Dies entspricht den Ergebnissen von Tsutsui et al. (2003b) und Kmenta et al. (2011), die mittels Rose-Bengal-Färbung bzw. nach Fixation in Hancock-Lösung über eine Lagerungsdauer von zwölf bzw. acht Tagen in mit TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünnern flüssigkonservierten Ejakulaten einen ähnlichen Anstieg des Anteils an morphologisch veränderten Samenzellen nachweisen konnten, und ist sinngemäß übereinstimmend mit den Resultaten weiterer Autoren, welche nach Flüssigkonservierung für eine Lagerungsdauer von drei bis zehn Tagen in TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünnern bzw. in Trockenmagermilch-Glukose-Verdünner mittels Nigrosin-Eosin-Färbung signifikante Reduktionen des Anteils an Samenzellen mit normaler Morphologie nachweisen konnten (England und Ponzio, 1996; Rijsselaere et al., 2004b; Michael et al., 2009; 2010).
Nach Burgess et al. (2001) verursacht zwar die Zugabe eines glycerolhaltigen TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünners keine transmissionselektronenmikroskopisch erkennbaren ultrastrukturellen Veränderungen der Samenzellen, wohl aber die nachfolgende Kühlung. Letztere hat möglicherweise sowohl sofortige als auch verzögerte Effekte auf die Ultrastruktur der Spermien. Die sofortigen Effekte können die Spermien entweder töten oder sie durch Schädigung des Akrosoms befruchtungsunfähig machen, wohingegen die verzögerten Effekte durch Modifikation der Plasmamembranstruktur die Langlebigkeit der Spermien reduzieren können (Burgess et al., 2001). Demgegenüber wird nach Rijsselaere et al. (2002a) die Prävalenz von morphologischen Veränderungen in der Nigrosin-Eosin-Färbung in mit TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner aufgearbeiteten Proben durch eine dreitägige Lagerung bei 4°C nicht beeinflusst.
Bezüglich des Einflusses der Zentrifugation auf die Pathomorphologie der Samenzellen lassen sich in der Literatur kontroverse Aussagen finden: Nach Koderle et al. (2009) ist in vor dem Einfrieren zentrifugierten Proben der Prozentsatz an morphologisch veränderten Spermien (bestimmt nach Fixation in Hancock-Lösung) nach dem Auftauen signifikant höher als in nicht zentrifugierten Proben und auch nach WHO (2010) kann es durch die Zentrifugation zu einer Beeinflussung der Spermienmorphologie kommen. Daher muss auch bei der Flüssigkonservierung eine Beeinflussung der Pathomorphologie durch die Zentrifugation in Betracht gezogen werden. Während nicht ausgeschlossen werden kann, dass die nachteiligen Effekte der Zentrifugation durch mechanische Schädigungen, welche durch die Zentrifugationskraft verursacht werden, zustande

kommen (Koderle et al., 2009), konnten Rijsselaere et al. (2002a) bezüglich der Pathomorphologie keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten finden. In der vorliegenden Arbeit konnte eine nachteilige Beeinflussung der Morphologie der Samenzellen durch die Zentrifugation nicht nachgewiesen werden, da der Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen in zentrifugierten Proben nicht signifikant höher war als in nicht zentrifugierten Proben.

Während in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Pathomorphologie unmittelbar nach dem Verdünnen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Verdünnern bestanden (siehe Kap. 5.3.2.4), war dies wohl aber bei Betrachtung des gesamten Zeitverlaufs der Flüssigkonservierung der Fall. Hier unterschieden sich die Verdünner CP und TE signifikant voneinander, wobei im Verdünner TE bis einschließlich Tag 3 ein höherer Anteil an morphologisch veränderten Spermien beobachtet werden konnte als im Verdünner CP, während die Zeitverläufe über den restlichen Untersuchungszeitraum sehr ähnlich waren. Des Weiteren konnte zwischen den mit CP und den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten ein signifikanter Unterschied der Zeitverläufe ermittelt werden. Dabei war zunächst in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten bis einschließlich Tag 2 ein höherer Anteil an morphologisch veränderten Spermien festzustellen und im Anschluss ab Tag 3 dann stets ein niedrigerer Anteil als in den mit CP aufgearbeiteten Ejakulaten.
Insgesamt war der Gesamtanteil an morphologisch veränderten Samenzellen über den Untersuchungszeitraum ab Tag 3 in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten niedriger als in den übrigen Proben. Die Zeitverläufe der mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulate unterschieden sich ab Tag 3 kaum voneinander. Daher konnte bezüglich der Pathomorphologie der Verdünner Up 1 + 2 als bester unter den getesteten Verdünnern angesehen werden, wenn auch ein statistisch signifikanter Unterschied nur zum Verdünner CP, nicht aber zum Verdünner TE, nachgewiesen werden konnte. Jedoch waren die Ergebnisse auch in den übrigen Verdünnern als gut zu bewerten. Dabei war der Verdünner CP dem Verdünner TE bis Tag 3 signifikant überlegen.
Gleiche Tendenzen wie für den Gesamtanteil an morphologisch veränderten Samenzellen ließen sich bei getrennter Betrachtung der einzelnen morphologischen Veränderungen beobachten. Auch hier war der Verdünner

Up 1 + 2 im Zeitverlauf den anderen Verdünnern überlegen. Statistische Signifikanzen konnten für den Anteil an Schwanzveränderungen sowie für den Anteil an schleifenförmigen Schwänzen ermittelt werden. Ebenso war der Verdünner CP im Zeitverlauf wieder dem Verdünner TE überlegen. Auch hier konnten statistische Signifikanzen für den Anteil an Schwanzveränderungen sowie für den Anteil an schleifenförmigen Schwänzen nachgewiesen werden.

Ebenso wie die beobachteten Abnahmen des Gesamtanteils an morphologisch veränderten Samenzellen in den verdünnten Ejakulaten unmittelbar nach dem Verdünnen (siehe Kap. 5.3.2.4), waren auch die weitere Abnahme in den mit Up 1 verdünnten Proben bis einschließlich Tag 2 und die zwischenzeitliche Abnahme in den mit Up 1 + 2 aufgearbeiteten Ejakulaten zwischen Tag 2 und Tag 5 nicht nachvollziehbar. Jedoch konnte eine zwischenzeitliche Verringerung des Anteils an morphologisch veränderten Spermien (zwischen Tag 4 und Tag 6) bei Flüssigkonservierung in einem TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner auch bei Tsutsui et al. (2003b) gefunden werden. Wie bereits zuvor diskutiert, könnte möglicherweise eine Agglutination der Spermien im Eosinausstrich (Burgess et al., 2001) oder eine Sedimentation morphologisch veränderter Spermienformen für diese Ergebnisse verantwortlich sein. Auffällig war allerdings, dass es in den mit CP und TE verdünnten Ejakulaten im Zeitverlauf zu keiner Verringerung des Anteils an morphologisch veränderten Spermien kam. Daher müssen zum einen fehlerhafte Messungen in den mit Up 1 + 2 und Up 1 verdünnten Ejakulaten in Betracht gezogen werden, zum anderen könnte jedoch auch die unterschiedliche Zusammensetzung der Verdünner ursächlich für die gemachten Beobachtungen sein, da nur in den glycerolhaltigen Verdünnern Up 1 + 2 und Up 1 Abnahmen des Anteils an morphologisch veränderten Spermien im Zeitverlauf nachgewiesen wurden. Es ist denkbar, dass es, bedingt durch die höhere Viskosität der glycerolhaltigen Verdünner, zu einer vermehrten Agglutination der Spermien im Eosinausstrich, wie sie von Burgess et al. (2001) beschrieben wurde, kam.

Bei getrennter Betrachtung der einzelnen morphologischen Veränderungen fiel auf, dass es im Zeitverlauf in fast allen verdünnten Ejakulaten zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an Schwanzveränderungen kam. Dies ist z. T. übereinstimmend mit Tsutsui et al. (2003b), welche mittels Rose-Bengal-Färbung nachweisen konnten, dass in verdünntem Sperma vor allem die Veränderungen an Mittelstück und Schwanz der Samenzellen ansteigen. Während an Tag 0

bereits in den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten eine signifikante Zunahme des Anteils an Samenzellen mit schleifenförmigen Schwänzen im Vergleich zum Nativsperma zu erkennen war (siehe Kap. 5.3.2.4), so konnte im Zeitverlauf dann in allen verdünnten Ejakulaten eine signifikanten Zunahme des Anteils an schleifenförmigen Schwänzen beobachtet werden. Die Anteile an aufgerollten Schwänzen und an Knickschwänzen zeigten demgegenüber nur teilweise einen signifikanten Anstieg. Diese Beobachtungen könnten darauf hindeuten, dass es durch die Flüssigkonservierung bevorzugt zu Schwanzveränderungen in Form von schleifenförmigen Schwänzen kommt.

5.3.3.4 Akrosomale Veränderungen

Die Integrität des Akrosoms ist wesentlich für den Befruchtungsvorgang (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b). In flüssigkonserviertem Sperma erreicht der Prozentsatz an akrosomreagierten Spermien in caninem Kapazitationsmedium sein Maximum früher als in nativem Sperma, weshalb es wahrscheinlich ist, dass die Spermalagerung bei 5°C die AR initiiert bzw. triggert, was jedoch nicht auf eine Beeinträchtigung der Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen hinausläuft (Kumi-Diaka und Badtram, 1994). Demgegenüber kann nach Iguer-Ouada und Verstegen (2001b) eine Aktivierung der AR während der Flüssigkonservierung zu einer schnellen Verminderung der Fertilität des Spermas führen. Eigelb als Verdünnerbestandteil scheint die Samenzellen gegen eine spontane AR zu schützen, wobei der Mechanismus, durch den Eigelb das Akrosom stabilisiert unklar ist. Möglicherweise handelt es sich um einen direkten protektiven Effekt auf die akrosomale Membran (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b). Aufgrund des fehlenden Zusammenhangs zwischen Motilität und akrosomaler Integrität in verdünnten Ejakulaten (Oettlé, 1986), sollte letztere zur Beurteilung der Qualität von flüssigkonserviertem Sperma stets gesondert untersucht werden.

Während der Anteil an Samenzellen mit abgelöstem Akrosom in unverdünntem Sperma bei einer Lagerung bei 4°C rapide ansteigt und nach vier Tagen einen durchschnittlichen Wert von 17,8 % erreicht, kommt es in verdünntem Sperma nur zu einem allmählichen Anstieg; nach zwölf Tagen Flüssigkonservierung in TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner beträgt der mittels Triple-Färbetechnik bestimmte Anteil an Samenzellen mit Verlust des Akrosoms etwa 11 % (Tsutsui et al., 2003b).

Auch in der vorliegenden Untersuchung kam es in den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten im Zeitverlauf der Flüssigkonservierung bei 4°C über zehn Tage zu signifikanten Zunahmen des mittels Spermac®-Färbung bestimmten Anteils an Samenzellen mit Kopfkappenveränderungen ($p_{Zeit} = 0{,}0006$ bis $< 0{,}0001$). Ebenso konnten bei getrennter Betrachtung der einzelnen Kopfkappenveränderungen in den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten signifikante Zunahmen der Anteile an abgelösten Kopfkappen, an schiefen Kopfkappen und an sonstigen Veränderungen ermittelt werden. Dies ist sinngemäß übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Autoren, welche nach Flüssigkonservierung für eine Lagerungsdauer von 3 bis 23 Tagen in TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünnern bzw. in Trockenmagermilch-Glukose-Verdünner mittels Spermac®-, Nigrosin-Eosin- oder FITC-PNA-Fluoreszenzfärbung signifikante Abnahmen des Anteils an Samenzellen mit intakten Akrosomen nachweisen konnten (England und Ponzio, 1996; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007; Michael et al., 2009; 2010). Allerdings war, verglichen mit den Zunahmen des Anteils an Samenzellen mit akrosomalen Veränderungen in den eigenen Untersuchungen, das Ausmaß der Abnahmen des Anteils an Samenzellen mit intakten Akrosomen bei einigen der genannten Autoren wesentlich höher: Michael et al. konnten nach drei Tagen Flüssigkonservierung nur noch einen Anteil von etwa 38 % (2009) bzw. rund 24 % (2010) beobachten und England und Ponzio (1996) nach zehn Tagen einen Anteil von 18-33 %. Dagegen wiesen bei Shahiduzzaman und Linde-Forsberg (2007) nach zehn Tagen noch etwa 53 % der Samenzellen intakte Akrosome auf und nach 23 Tagen noch rund 20 %. Wie bereits zuvor erwähnt, müssen bei solch einem Vergleich jedoch Abweichungen bezüglich der Zusammensetzung der Verdünner und Unterschiede in der Methodik berücksichtigt werden.

Nach Burgess et al. (2001) verursacht zwar die Verdünnerzugabe keine signifikanten ultrastrukturellen Veränderungen der Samenzellen, wohingegen aber die anschließende Kühlung, verglichen mit dem Nativsperma, in einem sofortigen (nicht signifikanten) Anstieg der Anzahl an transmissionselektronenmikroskopisch erkennbaren akrosomalen Veränderungen resultiert. Dieser Anstieg wird hauptsächlich durch Schwellung und Wellung der Akrosome verursacht. Durch die Inkubation des zuvor gekühlten Spermas bei 39°C kommt es zu keinem nennenswerten weiteren Anstieg (Burgess et al., 2001). Demgegenüber kommt es bei Oettlé (1986) sowohl durch die Verdünnung des Spermas als auch durch die

nachfolgende Kühlung zu einer Zunahme der akrosomalen Veränderungen in der Spermac®-Färbung, wobei die Kühlung relativ mehr Schäden am Akrosom verursacht als die Verdünnung.
Im Gegensatz zu den mit CP, TE und Up 1 verdünnten Ejakulaten konnte in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten über den Untersuchungszeitraum keine signifikante Zunahme des Anteils an Spermien mit akrosomalen Veränderungen nachgewiesen werden; hier war der durchschnittliche prozentuale Anteil an Tag 10 (4,0 %) sogar niedriger als an Tag 0 (6,6 %). Letzteres war, ebenso wie die zwischenzeitlichen Abnahmen in den mit CP verdünnten Ejakulaten an den Tagen 3 und 5, in den mit TE verdünnten Ejakulaten an Tag 3 und in den mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulaten an den Tagen 2, 3, 5 und 10, nicht nachvollziehbar. Einzig in den mit Up 1 verdünnten Ejakulaten waren keine zwischenzeitlichen Abnahmen zu beobachten.
Nach Sirivaidyapong et al. (2001) wird die akrosomale Integrität weder durch die Verdünnung noch durch die Kühlung auf 4°C beeinflusst. Auch Rota et al. (1995) konnten in mit TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner flüssigkonservierten Ejakulaten über einen Untersuchungszeitraum von vier Tagen mittels Spermac®-Färbung keine signifikanten Zunahmen des Anteils an akrosomalen Veränderungen in Form von vesikulierten oder geschwollenen Akrosomen sowie Verlust des Akrosoms nachweisen. Dies entspricht den Ergebnissen von Rijsselaere et al. (2002a; 2004b), nach denen eine drei- bzw. viertägige Flüssigkonservierung bei 4°C in TRIS-Fruktose-Eigelb- bzw. TRIS-Glukose-Eigelb-Verdünner keine signifikante Reduktion des Prozentsatzes an Samenzellen mit intaktem Akrosom (bestimmt nach Fluoreszenzfärbung mit FITC-PSA) induziert. Ebenso kam es bei Iguer-Ouada und Verstegen (2001b) während der Flüssigkonservierung in TRIS-Glukose-Eigelb- und TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünnern nur zu einer leichten Zunahme des Prozentsatzes an Samenzellen mit Verlust des Akrosoms (bestimmt nach Chlortetracyclinfärbung); nach neun Tagen lagen die durchschnittlichen Werte in beiden Verdünnern unter 10 %. Auch bei Ponglowhapan et al. (2004) war in mit TRIS-Eigelb-Verdünnern mit Glukose- oder Fruktosezusatz flüssig-konservierten Ejakulaten in den ersten drei Tagen nach Herstellung kein signifikanter Anstieg des Prozentsatzes an Samenzellen mit Verlust des Akrosoms (bestimmt nach FITC-PNA-Fluoreszenzfärbung) nachweisbar; meist kam es erst nach mindestens zehn Tagen zu einem signifikanten Anstieg. Es konnten weder zwischen den verschiedenen Zuckerkomponenten (Glukose oder Fruktose) noch

zwischen verschiedenen Zuckerkonzentrationen (10 mM oder 70 mM) signifikante Unterschiede bezüglich des Prozentsatzes an Spermien mit Akrosomverlust nachgewiesen werden (Ponglowhapan et al., 2004).

Insgesamt machen die vorliegenden Ergebnisse deutlich, dass im Verlauf der Flüssigkonservierung mit einer Zunahme akrosomaler Veränderungen gerechnet werden muss. Allerdings ist deren Ausmaß in den ersten Lagerungstagen als gering zu beurteilen, was sich mit den oben beschriebenen Beobachtungen anderer Autoren deckt. In der vorliegenden Arbeit kam es insbesondere zwischen Tag 7 und Tag 10 zu einem Anstieg der akrosomalen Veränderungen (CP, TE, Up 1). Daher ist davon auszugehen, dass auf Basis der akrosomalen Integrität in flüssigkonservierten Ejakulaten eine gute Spermaqualität für mindestens sieben Tage aufrechterhalten werden kann. Jedoch waren auch die durchschnittlichen Werte nach zehn Tagen in allen getesteten Verdünnern als gut zu bewerten: Während in den Verdünnern CP, TE und Up 1 im Mittel 7,6 %, 8,5 % und 8,2 % der Samenzellen akrosomale Veränderungen aufwiesen, war dies im Verdünner Up 1 + 2 nur bei 4,0 % der Samenzellen der Fall.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann zum einen bestätigt werden, dass die Zentrifugation keine ungünstigen Auswirkungen auf den Anteil an akrosomintakten Samenzellen hat (Günzel, 1986) und zum anderen dass durch Prostatasekret die akrosomale Integrität von flüssigkonservierten Samenzellen auch über eine Lagerungsdauer von zehn Tagen nicht nachteilig beeinflusst wird (Sirivaidyapong et al., 2001). Letzteres widerlegt die für Tag 0 aufgestellte Hypothese (siehe Kap. 5.3.2.5) und widerspricht den Aussagen von Rijsselaere et al. (2002a) und Rota et al. (1995), dass Prostatasekret/Seminalplasma für die Flüssigkonservierung von Hundesperma bei 4 °C ungeeignet ist.

5.3.4 Korrelationen der untersuchten Parameter

5.3.4.1 Dichten

Nach Günzel-Apel et al. (1993) sind die mittels konventioneller Zählkammer bestimmten Spermienkonzentrationen signifikant mit den mittels Cellsoft Computer Videomicrography System gemessenen Konzentrationen korreliert. Ebenso konnten Rijsselaere et al. (2003) eine signifikante Korrelation zwischen der konventionellen Konzentrationsbestimmung mittels Bürker-Zählkammer und der Konzentrationsmessung durch den HTR Ceros 12.1 ermitteln, wobei die

Unterschätzung durch den HTR Ceros 12.1 durchschnittlich 14,8 % betrug. Auch Schäfer-Somi et al. (2006) konnten in nativem Sperma eine signifikante Korrelation zwischen der Konzentrationsbestimmung mittels Thoma-Zählkammer und der mittels SpermVision nachweisen.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Korrelation zwischen den mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten und den durch CASA (SpermVision™-System) gemessenen Dichten ermittelt werden ($r = 0,708$, $p < 0,001$), wobei die mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten Mittelwerte fast immer über den durch CASA gemessenen Mittelwerten lagen. Lediglich für die mit Up 1 verdünnten Ejakulate konnte mittels CASA eine leicht höhere durchschnittliche Dichte ermittelt werden als mittels Neubauer-Zählkammer. Im Gegensatz zu den verdünnten Ejakulaten war die Abweichung zwischen den mit beiden Methoden bestimmten Mittelwerten bei den Nativejakulaten stärker ausgeprägt, was sich auch bei den Korrelationsanalysen nach Nativsperma und nach den einzelnen Verdünnern getrennt deutlich am Korrelationskoeffizienten zeigte ($r = 0,539$, $p = 0,002$). Die mittels CASA gemessenen Spermienkonzentrationen lagen in den Nativejakulaten stets weit unter den mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten Werten. Dies ist übereinstimmend mit der von Rijsselaere et al. (2003) beschriebenen Unterschätzung der Spermienkonzentration durch CASA-Systeme, welche mit steigenden Spermienkonzentrationen zunimmt. Eine Unterschätzung der Spermienkonzentration konnte in weit geringerer Ausprägung jedoch auch bei den verdünnten Ejakulaten festgestellt werden. Dass die Unterschätzung der Spermienkonzentration durch CASA in der vorliegenden Arbeit mit steigenden Spermienkonzentrationen zunahm bzw. dass die Abweichungen zwischen beiden Methoden mit steigenden Spermienkonzentrationen größer wurden, ist auch deutlich in der graphischen Darstellung des Zusammenhang zwischen den mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten und den durch CASA ermittelten Dichten zu erkennen (siehe Abb. 20, Kap. 4.4.1.2).

Nach Kuster (2005) sind die bei der Konzentrationsbestimmung auftretenden Unterschiede zwischen CASA-Systemen, welche mit Zählkammern von 20 µm Tiefe arbeiten, und Hämozytometern durch den Segre-Silberberg-Effekt bedingt, welcher während des „Poiseuille Flusses“ in dünnen und sich durch Kapillarkräfte füllenden Zählkammern auftritt. Durch diesen Effekt ist die Spermienkonzentration in den Messbereichen der 20 µm-Zählkammern niedriger als die wahre Spermien-konzentration der Proben. Dagegen scheint dieser Effekt in Hämozytometern, die

mit 100 µm wesentlich tiefer sind als die meisten Einweg-Zählkammern, keine Rolle zu spielen. Folglich bleibt die Hämozytometrie der Golden Standard für die Bestimmung der Spermienkonzentration (Kuster, 2005).

5.3.4.2 Motilität

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Korrelation der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit mit der mittels CASA gemessenen Vorwärtsbeweglichkeit nachgewiesen werden ($r = 0{,}885$; $p < 0{,}001$), wobei die subjektiv geschätzten Mittelwerte durchschnittlich 12,5 ± 11,5 % über den mittels CASA bestimmten Werten lagen. Bei getrennter Betrachtung der Nativejakulate und der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate fiel auf, dass in den verdünnten Ejakulaten engere Korrelationen beobachtet werden konnten als in den Nativejakulaten (siehe Kap. 4.4.2.1), was jedoch durch die im Vergleich zum Nativsperma höhere Anzahl an getesteten Variablenpaaren bei den verdünnten Proben oder durch die Verdünnung auf annähernd optimale Konzentrationen für die CASA-Messungen (50-100 x 10^6 Spermien pro ml) bedingt sein könnte. Die ermittelten Korrelationen sind übereinstimmend mit den Aussagen in der Literatur (Günzel-Apel et al., 1993; Rijsselaere et al., 2003; Schäfer-Somi et al., 2006; Schäfer-Somi und Aurich, 2007). Fraglich ist jedoch, ob niedrige Motilitätsraten höhere Abweichungen zwischen der durch CASA bestimmten und der geschätzten Motilität bedingen (Günzel-Apel et al., 1993).
Im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen lag die durch SpermVision ermittelte Gesamtmotilität bei Schäfer-Somi und Aurich (2007) immer über der geschätzten Motilität. Übereinstimmend mit den eigenen Untersuchungen wiesen auch Gröpper (2004) und Rota et al. (2001) niedrigere Motilitätswerte mittels CASA im Vergleich mit der subjektiven Beurteilung nach.
Möglicherweise kommen Unterschiede der mit den verschiedenen Methoden bestimmten Motilitätswerte durch eine schlechte Unterscheidung zwischen Eigelbpartikeln aus den Verdünnern und unbeweglichen Samenzellen seitens des CASA-Systems zustande, wenn die Partikel eine ähnliche Größe besitzen wie die Spermienköpfe (Verstegen et al., 2002). So könnte es zu einer Erhöhung des gemessenen Anteils an unbeweglichen Samenzellen gekommen sein, was letztlich in einer Unterschätzung der wahren Motilität resultierte. Allerdings wurde die Spermienerkennung während der CASA-Messungen in der vorliegenden Untersuchung stets verfolgt und es konnten kaum Fehlerkennungen beobachtet

werden. Eine vorherige Filtration der Verdünner zur Eliminierung der Eigelbpartikel kann diese Fehlerquelle ausschließen (Günzel-Apel et al., 1993).

5.3.4.3 Viabilität

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten eine signifikante Korrelation des mittels Eosinausstrich bestimmten Anteils an lebenden Samenzellen mit der mittels CASA gemessenen Viabilität ($r = 0{,}743$; $p < 0{,}001$), wobei der Anteil lebender Samenzellen durchschnittlich $12{,}5 \pm 10{,}8$ % höher war als die CASA-Viabilität. Bei getrennter Betrachtung der Nativejakulate und der mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Ejakulate konnten, wie auch schon bei der Motilität beobachtet, in den verdünnten Ejakulaten engere Korrelationen nachgewiesen werden als in den Nativejakulaten (siehe Kap. 4.4.3.1).

In der Literatur konnten bezüglich der Viabilität weitere Übereinstimmungen zwischen konventionellen und modernen spermatologischen Analysemethoden gefunden werden. Peña et al. (1998b; 2001) konnten beim Vergleich von durchflusszytometrischer Untersuchung CFDA/PI-gefärbter Proben, mikroskopischer Beurteilung CFDA/PI-gefärbter Proben unter Epifluoreszenz-beleuchtung und Untersuchung Eosin/Nigrosin-gefärbter Proben mittels Phasenkontrastmikroskop für frisch verdünntes Sperma hohe Korrelationen zwischen allen drei Methoden nachweisen. Auch Schäfer-Somi und Aurich (2007) konnten in mit TRIS-Puffer verdünnten Ejakulaten eine signifikante Korrelation der mittels SpermVision nach SYBR-14/PI-Färbung gemessenen Membranintegrität und der nach CFDA-Färbung mittels fluoreszenzmikroskopischer Auszählung bestimmten Membranintegrität nachweisen.

Beim Vergleich der SYBR-14/PI-Färbung (Beurteilung unter dem Fluoreszenz-mikroskop) mit der Nigrosin/Eosin-Färbung sehen Rijsselaere et al. (2002a) die Färbung mit SYBR-14/PI als die sensitivere Methode an, da durch diese Fluoreszenztechnik selbst kleinste, durch die Zentrifugation verursachte Membranschäden erkannt werden können, indem drei Zellpopulationen (lebende, tote und moribunde Samenzellen) identifiziert werden. Letztere lassen sich durch die konventionelle Nigrosin-Eosin-Färbung nicht nachweisen (Rijsselaere et al., 2002a).

Niżański und Klimowicz (2005) wiesen in nativem Sperma signifikante Korrelationskoeffizienten zwischen dem durchflusszytometrisch bestimmten Prozentsatz an grün und rot fluoreszierenden Spermien nach SYBR-14/PI-

Färbung und dem mikroskopisch ermittelten Prozentsatz an lebenden oder toten Spermien in Nigrosin-Eosin-Ausstrichen nach. In flüssigkonserviertem Sperma waren die Korrelationskoeffizienten niedriger. Während der Flüssigkonservierung bei 5°C für zehn Tage war der Prozentsatz an grün fluoreszierenden Spermien nach SYBR-14/PI-Färbung stets niedriger als der Prozentsatz an lebenden Spermien in den Nigrosin-Eosin-Ausstrichen (Niżański und Klimowicz, 2005). Letzteres war in ähnlicher Weise auch in den vorliegenden Untersuchungen zu beobachten. Möglicherweise kann auch hierfür der von Rijsselaere et al. (2002a) beschriebene Erklärungsansatz herangezogen werden (siehe oben).

5.3.4.4 Spermaparameter

Die Berechnung verschiedener Korrelationen sollte zur Aufklärung möglicher Zusammenhänge zwischen einzelnen Parametern beitragen.
Sowohl für die subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit ($r = -0{,}501$; $p < 0{,}001$) und die CASA-Vorwärtsbeweglichkeit ($r = -0{,}538$; $p < 0{,}001$) als auch für den Anteil an lebenden Samenzellen im Eosinausstrich ($r = -0{,}672$; $p < 0{,}001$) und die CASA-Viabilität ($r = -0{,}535$; $p < 0{,}001$) konnten signifikante negative Korrelationen mit dem Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen nachgewiesen werden. Die negative Korrelation zwischen der CASA-Vorwärtsbeweglichkeit und dem Anteil an morphologisch veränderten Samenzellen war vergleichbar mit der von Ellington et al. (1993) ermittelten signifikanten positiven Korrelation zwischen dem Prozentsatz an vorwärtsbeweglichen Samenzellen (CASA) und dem Prozentsatz an Samenzellen mit normaler Morphologie (Wright-Giemsa-Färbung). Hingegen ist nach Kumi-Diaka (1993) die subjektiv geschätzte Motilität weder mit dem Anteil an Mittelstückveränderungen der Samenzellen noch mit dem Anteil an Schwanzveränderungen signifikant korreliert.
Weiterhin waren subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit ($r = -0{,}525$; $p < 0{,}001$), die CASA-Gesamtmotilität ($r = -0{,}523$; $p < 0{,}001$) sowie die CASA-Vorwärtsbeweglichkeit ($r = -0{,}552$; $p < 0{,}001$) negativ korreliert mit dem Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test. Dieser Zusammenhang erscheint plausibel, da die Motilität teils von Transportmechanismen der Membran und somit von der Integrität der Plasmamembran und teils von anderen biochemischen Aktivitäten des Spermienmetabolismus abhängig ist (Jeyendran et al., 1984; Kumi-Diaka, 1993). Obwohl England und Plummer (1993) keine Korrelation zwischen dem HOS-Test und der Motilität verifizieren konnten, gelang

der Nachweis signifikanter positiver Korrelationen zwischen dem HOS-Test und der Spermienmotilität (subjektiv geschätzte Gesamtmotilität und subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit bzw. CASA-Gesamtmotilität und CASA-Vorwärtsbeweglichkeit) zahlreichen Autoren in nativem (Kumi-Diaka, 1993; Kumi-Diaka und Badtram, 1994; Rodríguez-Gil et al., 1994; Pinto und Kozink, 2008), in 24 Std. bei 4°C gelagertem unverdünntem (Rodríguez-Gil et al., 1994), in verdünntem (Kumi-Diaka und Badtram, 1994) und in aufgetautem TG-Sperma (Rota et al., 2006; Pinto und Kozink, 2008).

Auch der Anteil an lebenden Samenzellen im Eosinausstrich ($r = -0,522$; $p < 0,001$) und die CASA-Viabilität ($r = -0,724$; $p < 0,001$) waren negativ korreliert mit dem Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test. Dies bestätigt sinngemäß die Ergebnisse von Rodríguez-Gil et al. (1994), welche für natives Sperma sowie für 24 Stunden bei 4°C gelagertes, unverdünntes Sperma signifikante positive Korrelationen zwischen dem HOS-Test (Prozentsatz an geschwollenen Spermienschwänzen) und der Viabilität (Färbung mit Trypanblau und Giemsa) nachweisen konnten und ebenso die Ergebnisse von Pinto und Kozink (2008), welche für natives sowie für aufgetautes Sperma eine signifikante positive Korrelation zwischen dem HOS-Test (Anteil an Spermien mit aufgerollter Geißel) und der Spermienviabilität (Eosin-Nigrosin-Färbung) ermitteln konnten. Auch Jeyendran et al. (1984) konnten für humanes Sperma eine signifikante positive Korrelation zwischen dem HOS-Test (Prozentsatz an geschwollenen Spermienschwänzen) und dem Anteil an lebenden Samenzellen im Eosinausstrich verifizieren. Im Gegensatz dazu, konnten England und Plummer (1993) keine Korrelation zwischen dem HOS-Test und der Vitalfärbung finden und auch nach Kumi-Diaka und Badtram (1994) besteht zwischen dem HOS-Test und der Lebend-Tot-Färbung keine signifikante Korrelation.

Die bislang publizierten Zusammenhänge zwischen Pathomorphologie und HOS-Test sind kontrovers: Während England und Plummer (1993) keine Korrelation zwischen der Morphologie und dem HOS-Test nachweisen konnten und auch nach Kumi-Diaka (1993) der HOS-Test weder mit dem Anteil an Mittelstückveränderungen noch mit dem Anteil an Schwanzveränderungen signifikant korreliert ist, konnte in den eigenen Untersuchungen sinngemäß übereinstimmend mit Jeyendran et al. (1984) und Pinto und Kozink (2008) eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Anteil an morphologisch

veränderten Samenzellen und dem Anteil an Samenzellen mit nicht aufgerollter Geißel im HOS-Test ermittelt werden ($r = 0,446$; $p < 0,001$).

5.4 Schlussbetrachtung und Fazit für die Praxis

Die Flüssigkonservierung bei 4°C für zehn Tage bewirkte in der vorliegenden Untersuchung in allen verdünnten Ejakulaten eine signifikante Abnahme der Motilität, eine signifikante Verlangsamung der Spermiengeschwindigkeit und eine signifikante Verminderung der Viabilität, während für die Pathomorphologie und den Anteil an Samenzellen mit akrosomalen Veränderungen in fast allen verdünnten Ejakulaten signifikante Zunahmen nachgewiesen wurden. Demgegenüber veränderten sich die Gradlinigkeit der Spermienbewegung (STR) sowie die Anteile an Kopf- und Halsveränderungen der Samenzellen durch die Flüssigkonservierung nicht signifikant. Eine zusätzliche nachteilige Beeinflussung der Spermaqualität in den flüssigkonservierten Ejakulaten durch geringe Blutbeimengungen war, übereinstimmend mit Rijsselaere et al. (2004b), nicht zu beobachten.

Insgesamt konnte in den flüssigkonservierten Ejakulaten beurteilt anhand der Motilität je nach Verdünner eine akzeptable Spermaqualität über mindestens ein bis zwei (Up 1 + 2) bzw. fünf (Up 1) bzw. zehn Tage (CP, TE) aufrechterhalten werden. Hingegen ließ sich hinsichtlich der Viabilität, der Pathomorphologie und des Anteils an Samenzellen mit akrosomalen Veränderungen in fast allen verdünnten Ejakulaten (CP, TE, Up 1) bis Tag 10 eine akzeptable Spermaqualität konservieren. Dieser Zeitraum erscheint, ein gutes Besamungsmanagement vorausgesetzt, ausreichend für den nationalen sowie für den internationalen Versand des flüssigkonservierten Spermas und für die anschließende Lagerung am Bestimmungsort bis zur Verwendung zur KB. Auch eine zweimalige KB im Abstand von 24 bzw. 48 Stunden sollte in diesem Zeitraum möglich sein.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den am besten geeigneten Verdünner für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma bei 4°C über eine Lagerungsdauer von zehn Tagen zu bestimmen.

Bezüglich der Erhaltung der Motilität erwies sich der Verdünner CP den übrigen Verdünnern eindeutig als signifikant überlegen. Der Verdünner TE zeigte wiederum eine signifikante Überlegenheit gegenüber den Verdünnern Up 1 + 2 und

Up 1. Im Verdünner Up 1 + 2 wurde eine gute Motilität lediglich über 24 Stunden erhalten, im Verdünner Up 1 dagegen bis einschließlich Tag 5. Hinsichtlich der Konservierung der Viabilität war der Verdünner Up 1 den anderen Verdünnern signifikant überlegen. Die Verdünner CP und TE zeigten wiederum eine tendenziell (Anteil an lebenden Samenzellen im Eosinausstrich) bzw. eine signifikant (CASA-Viabilität) bessere Konservierung der Viabilität als der Verdünner Up 1 + 2. Bezüglich der Pathomorphologie erschien der Verdünner Up 1 + 2 den übrigen Verdünnern tendenziell überlegen. Eine statistische Signifikanz ließ sich jedoch nur im Vergleich zum Verdünner CP ermitteln. Der Verdünner CP war hinsichtlich der Pathomorphologie wiederum dem Verdünner TE signifikant überlegen.
Insgesamt betrachtet war der Verdünner CP der am besten geeignete Verdünner für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma bei 4°C über eine Lagerungsdauer von zehn Tagen, was insbesondere durch die gute Erhaltung der Motilität zum Ausdruck kam. Jedoch erwies sich auch der Verdünner TE für die Flüssigkonservierung von Hundesperma über einen Zeitraum von zehn Tagen als brauchbar. Eindeutige Vorteile des Verdünners CP gegenüber dem Verdünner TE sind seine schnelle Verfügbarkeit und die einfache Handhabung.
Die Flüssigkonservierung mit dem Verdünner Up 1 + 2 kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht empfohlen werden, da die Resultate für die Motilität und die Viabilität absolut nicht zufriedenstellend waren. Im Gegensatz dazu muss von der Verwendung von Verdünner Up 1 zur Flüssigkonservierung caniner Ejakulate nicht prinzipiell abgeraten werden, da mit diesem Verdünner über mindestens fünf Tage durchaus gute Ergebnisse erzielt werden konnten. Eine Kryokonservierung entsprechend aufgearbeiteter Ejakulate nach Flüssigkonservierung für ein oder zwei Tage ohne signifikanten Qualitätsverlust nach dem Auftauen, verglichen mit der sofortigen Kryokonservierung, ist möglich (Hermansson und Linde-Forsberg, 2006).

Da für die Auswahl von geeigneten Verdünnern für die Flüssigkonservierung die objektive Beurteilung der Spermaqualitätsparameter von entscheidender Bedeutung ist, kam in der vorliegenden Arbeit, zusätzlich zu den subjektiven, konventionellen Untersuchungsmethoden, das CASA-System SpermVision™ zum Einsatz. Die mit beiden Methoden bestimmten Ergebnisse für die Spermienkonzentration, die Motilität sowie die Viabilität waren größtenteils als

annähernd gleichwertig anzusehen, was sich auch in den ermittelten Korrelationen widerspiegelte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die KB beim Hund von zunehmender Bedeutung ist. Daher sollten Praktiker, die diese Dienstleistung anbieten wollen, sowohl mit den Techniken zur Bestimmung des optimalen Besamungszeitpunktes und zur Samenübertragung als auch mit den Methoden der Spermakonservierung vertraut sein. Für die Flüssigkonservierung caniner Ejakulate kann auf Basis der vorliegenden Arbeit der kommerzielle Verdünner CP empfohlen werden. Dieser zeichnet sich durch eine gute Erhaltung der Spermaqualität über mindestens zehn Tage, eine schnelle Verfügbarkeit und eine einfache Handhabung aus, wodurch er für den Einsatz in der Praxis gut geeignet erscheint. Weiterhin scheint unter Praxisbedingungen die Beurteilung nativer sowie flüssigkonservierter Ejakulate mittels konventioneller Methoden ausreichend zu sein, da eine gute Übereinstimmung zu den objektiven Methoden besteht.

5.5 Offene Fragestellungen

Obwohl nach Verstegen et al. (2005) flüssigkonserviertes Sperma für mindestens elf Tage fertil zu bleiben scheint, sind weiterführende Studien notwendig, um die Fertilität des mit den verschiedenen Verdünnern aufgearbeiteten Spermas zu untersuchen. Für die Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit von Spermien in vitro kommen mehrere Tests in Frage: Hier sind der ZP-Bindungstest, der Hemizona-Bindungstest, der ZP-Penetrationstest sowie die IVF zu nennen (Ström Holst et al., 2000; 2001; Rijsselaere et al., 2005). Allerdings lassen in vitro Tests die Interaktion zwischen den Spermien und dem weiblichen Genitale außer Acht. Daher ist der beste Weg zur Untersuchung der Fertilität bzw. zur Untersuchung von Verdünnern für die Spermakonservierung der Vergleich von Konzeptionsraten nach KB (Oettlé, 1993; Rota et al., 1995). Da dies unter experimentellen Bedingungen beim Hund normalerweise nicht möglich ist, werden, wie auch in vorliegenden Arbeit, Spermiencharakteristika, die wichtig für die Befruchtungsfähigkeit sind, in vitro untersucht (Rota et al., 1995). Vor allem der Motilität wird bei der vergleichenden Untersuchung von Verdünnern viel Bedeutung zugemessen (Tsutsui et al., 2003b) und in einigen Untersuchungen wird sogar ausschließlich die Motilität beurteilt (Foote und Leonard, 1964;

Province et al., 1984; Bouchard et al., 1990). Verstegen et al. (2005) konnten jedoch deutlich zeigen, dass offensichtlich erkennbare Motilität oder Immotilität kein verlässliches Kriterium ist, um das Fertilitätspotenzial von caninem Sperma zu beurteilen. Deshalb sollte in zukünftigen Untersuchungen bestimmt werden, welche Spermaparameter für die Vorhersage der in vivo Fertilität am nützlichsten sind. Für bovines Sperma konnten beispielsweise zwischen den kombinierten Prozentsätzen von Motilität und Geschwindigkeit und der Fertilität hohe Korrelationen ermittelt werden (Farrell et al., 1998). Für canines Sperma ist jedoch noch immer unklar, welche der CASA-Motilitätsparameter von klinischem Wert für die Vorrausage der Fertilität einer gegebenen Spermaprobe sind (Verstegen et al., 2002). Zudem erschienen in der vorliegenden Arbeit auch die CASA-Einstellungen an sich teilweise als verbesserungswürdig, was ebenfalls weiterführender Untersuchungen bedarf.

6 Zusammenfassung

Evaluierung verschiedener Verdünner zur Flüssigkonservierung von caninem Sperma

Die künstliche Besamung gewinnt in der Hundezucht immer mehr an Bedeutung. Dabei können durch die Verwendung von flüssigkonserviertem Sperma selbst bei vaginaler Deponierung des Samens i. d. R. deutlich bessere Trächtigkeitsraten und höhere Wurfgrößen erzielt werden als mit kryokonserviertem Sperma, ein optimales Besamungsmanagement vorausgesetzt. Zudem ist die Flüssigkonservierung von Sperma hinsichtlich Herstellung und Versand einfacher und kostengünstiger als die Kryokonservierung. Limitierend beim Einsatz von flüssigkonserviertem Sperma ist jedoch die begrenzte Überlebensdauer der Samenzellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Splitsample-Verfahren drei verschiedene Verdünner für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma bei 4°C vergleichend untersucht. Dabei handelte es sich um den kommerziellen Verdünner CaniPRO™ Chill 10 (CP) und zwei nichtkommerzielle Verdünner (TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner (TE) und Uppsala Equex-2 System). Beim zweiphasigen Uppsala Equex-2 System waren zwei Versuchsteile zu unterscheiden: In Versuchsteil I erfolgte die Verdünnung mit Verdünner 1 und Verdünner 2 des Uppsala Equex-2 Systems (Up 1 + 2), in Versuchsteil II nur mit Verdünner 1 (Up 1). Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, den am besten geeigneten Verdünner für die Flüssigkonservierung von Hundesperma bei 4°C über einen Lagerungszeitraum von zehn Tagen zu bestimmen. Zudem sollte geprüft werden, wie lange eine akzeptable Spermaqualität in den verdünnten Ejakulaten aufrechterhalten werden kann. Dazu wurde von 30 Rüden jeweils ein Ejakulat fraktioniert gewonnen und die spermienreiche Fraktion mittels klassischer und moderner spermatologischer Untersuchungsmethoden (CASA-System SpermVision™) hinsichtlich Motilität (subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit (VW), CASA-Gesamtmotilität (GM_{CASA}), CASA-Vorwärtsbeweglichkeit (VW_{CASA})), Viabilität (Lebend-Tot-Anteil im Eosinausstrich (Lebende), CASA-Viabilität nach SYBR-14/PI-Färbung (Via_{CASA})), Pathomorphologie (Eosinausstrich; Patho), akrosomaler Veränderungen (Spermac®-Färbung; AV) und funktioneller Integrität der Plasmamembran (Anteil an membrandefekten Samenzellen im HOS-Test; HOS) beurteilt. Im Anschluss wurden die Ejakulate in drei Aliquote geteilt und es

erfolgte die Aufarbeitung mit den verschiedenen Verdünnern. Unmittelbar nach der Herstellung (Tag 0) wurden in den verdünnten Ejakulaten die gleichen Beurteilungsparameter untersucht wie in den Nativejakulaten. Nach 1, 2, 3, 5, 7 und 10 Tagen Lagerung bei 4°C wurden 100 µl-Aliquote der verdünnten Ejakulate für fünf Minuten im Wasserbad auf 37°C angewärmt und anschließend hinsichtlich VW, GM_{CASA}, VW_{CASA}, Lebende, Via_{CASA}, Patho und AV beurteilt.

Die in den Nativejakulaten untersuchten Spermaparameter variierten zwischen den verschiedenen Rüden. Die durchschnittlich ermittelten Werte waren: VW 80,8 ± 9,5 %, GM_{CASA} 70,9 ± 18,1 %, VW_{CASA} 65,0 ± 19,9 %, Lebende 87,4 % (80,6-92,9 %), Via_{CASA} 82,7 % (71,0-91,9 %), Patho 10,3 % (SF = 1,66), AV 2,7 % (SF = 2,63) und HOS 3,1 % (SF = 2,34). Durch die Verdünnung mit den verschiedenen Verdünnern wurden die untersuchten Parameter mit Ausnahme von HOS (CP: 5,0 % (SF = 2,23); TE: 4,7 % (SF = 2,12); Up 1 + 2: 8,0 % (SF = 2,16); Up 1: 4,3 % (SF = 1,69) nicht wesentlich beeinflusst (Tag 0). Insgesamt nahm die Spermaqualität über den Untersuchungszeitraum von zehn Tagen jedoch in allen verdünnten Ejakulaten kontinuierlich ab. Die Flüssigkonservierung bewirkte in allen verdünnten Ejakulaten eine signifikante Reduktion der Motilität (VW, GM_{CASA}, VW_{CASA}), eine signifikante Verlangsamung der Spermiengeschwindigkeit und eine signifikante Verminderung der Viabilität (Lebende, Via_{CASA}), wohingegen es in fast allen verdünnten Ejakulaten zu einer geringgradigen, aber signifikanten Zunahme der Pathomorphologie und zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an Samenzellen mit akrosomalen Veränderungen kam. Ausgehend von einer initialen VW von 77,8 ± 11,4 % (CP) / 77,2 ± 14,3 % (TE) / 73,8 ± 18,0 % (Up 1 + 2) / 75,8 ± 13,8 % (Up 1) unmittelbar nach der Herstellung (Tag 0) war nach zehn Tagen noch eine VW von 58,2 ± 22,1 % (CP) / 49,3 ± 23,9 % (TE) / 3,5 ± 4,6 % (Up 1 + 2) / 16,2 ± 12,1 % (Up 1), nachweisbar. Die Via_{CASA} an Tag 0 betrug 84,3 % (71,4-93,8 %) (CP) / 83,6 % (69,6-93,9 %) (TE) / 75,2 % (57,0-89,6 %) (Up 1 + 2) / 85,1 % (76,5-92,0 %) (Up 1) und verminderte sich über den Untersuchungszeitraum auf 58,8 % (41,7-74,9 %) (CP) / 59,7 % (40,8-77,3 %) (TE) / 37,7 % (22,2-54,6 %) (Up 1 + 2) / 68,0 % (57,6-77,5 %) (Up 1) an Tag 10. Demgegenüber nahm die Patho zwischen Tag 0 (CP: 7,4 % (SF = 2,21); TE: 8,2 % (SF = 1,93); Up 1 + 2: 7,9 % (SF = 2,08); Up 1: 9,3 % (SF = 1,72)) und Tag 10 (CP: 10,7 % (SF = 2,04); TE: 10,7 % (SF = 2,19); Up 1 + 2: 9,8 % (SF = 2,26); Up 1: 10,6 % (SF = 1,96)) zu und auch für die AV konnte mit Ausnahme der mit Up 1 + 2 verdünnten Ejakulate ein Anstieg zwischen Tag 0 (CP:

4,2 % (SF = 2,43); TE: 3,9 % (SF = 2,67); Up 1 + 2: 6,6 % (SF = 2,18); Up 1: 2,8 % (SF = 2,34)) und Tag 10 (CP: 7,6 % (SF = 2,57); TE: 8,5 % (SF = 2,14); Up 1 + 2: 4,0 % (SF = 2,72); Up 1: 8,2 % (SF = 1,78)) beobachtet werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass in den mit CP und TE verdünnten Ejakulaten für eine Lagerungsdauer von zehn Tagen eine akzeptable Spermaqualität aufrechterhalten werden konnte. Die Motilität (VW, GM_{CASA}, VW_{CASA}) sowie die Spermiengeschwindigkeit waren über den Untersuchungszeitraum im Verdünner CP signifikant höher als in den anderen getesteten Verdünnern. Bezüglich der Viabilität (Lebende, Via_{CASA}) erwies sich im Zeitverlauf der Verdünner Up 1 als signifikant überlegen. Bei Betrachtung der Pathomorphologie war der Verdünner Up 1 + 2 signifikant besser als der Verdünner CP und Letzterer wiederum signifikant besser als der Verdünner TE. Hinsichtlich der akrosomalen Veränderungen konnten mit dem Verdünner Up 1 signifikant bessere Ergebnisse erzielt werden als mit dem Verdünner CP. Insgesamt betrachtet wurde die Spermaqualität und insbesondere die Motilität jedoch im Verdünner CP am besten konserviert, auch wenn die Unterschiede zu den anderen getesteten Verdünnern nicht für alle Parameter signifikant waren. Aufgrund dessen scheint der Verdünner CP den anderen getesteten Verdünnern überlegen und wird daher für die Flüssigkonservierung von caninem Sperma bei 4°C empfohlen.

Da in der vorliegenden Arbeit allerdings ungeklärt bleibt, inwieweit sich die Fertilität des flüssigkonservierten Spermas im Zeitverlauf verändert und welche Auswirkungen die getesteten Verdünner auf den Erhalt der Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen haben, sind weitere Studien notwendig, um den Erhalt der Befruchtungsfähigkeit während der Langzeit-Flüssigkonservierung in vivo und in vitro näher zu charakterisieren.

7 Summary

Evaluation of different extenders for chilling of canine semen

The importance of artificial insemination in dog breeding has significantly increased during the last decade. Using chilled semen, higher pregnancy rates and litter sizes can be achieved compared to the use of cryopreserved semen, even after vaginal deposition, provided that there is an optimal insemination management. Furthermore, with regard to production and shipping, chilling of semen is easier to perform and cheaper than cryopreservation. However, the limited life span of sperm cells after chilling is limiting the use of extended semen.

In the present study, three different extenders were compared using split-sample technique for chilling of canine semen and storage at 4°C. It concerned the commercial extender CaniPRO™ Chill 10 (CP) and two non-commercial extenders (TRIS-fructose-egg yolk extender (TE) and Uppsala Equex-2 system). With the two-phase Uppsala Equex-2 system, two test parts have to be distinguished: In part I of the experiment, both extenders (Up 1 + 2) were used for dilution; whereas in part II of the experiment only extender 1 was used (Up 1). The aim of this study was to determine the most suitable extender for chilling of dog semen over a storage period of ten days at 4°C. In addition, it should be tested how long an acceptable semen quality can be maintained in the diluted samples. Therefore, from each of 30 males one fractionated ejaculate was collected and the sperm rich fraction was examined by means of classical and modern spermatological investigation methods (CASA-system SpermVision™) for motility (subjectively estimated progressive motility (VW), total motility determined by CASA (GM_{CASA}), progressive motility determined by CASA (VW_{CASA})), viability (live-dead ratio in eosin-stained smears (Lebende), viability determined by CASA after staining with SYBR-14/PI (Via_{CASA})), pathomorphology (eosin-stained smears; Patho), acrosomal changes (staining with Spermac®; AV) and functional integrity of the plasma membrane (percentage of sperm cells with membrane defects in the HOS test; HOS). Subsequently, the sperm rich fractions were divided into three equal aliquots and processed with the different extenders. Immediately after dilution (day 0) the same parameters were examined in the diluted ejaculates as in the native semen samples. After 1, 2, 3, 5, 7 and 10 days of storage at 4°C, aliquots of 100 µl of the diluted ejaculates were pre-warmed at 37°C in the water bath for five

minutes and subsequently examined for VW, GM_{CASA}, VW_{CASA}, Lebende, Via_{CASA}, Patho and AV.

In the fresh ejaculates, the investigated parameters varied between different males. The average values were: VW 80.8 ± 9.5 %, GM_{CASA} 70.9 ± 18.1 %, VW_{CASA} 65.0 ± 19.9 %, Lebende 87.4 % (80.6-92.9 %), Via_{CASA} 82.7 % (71.0-91.9 %), Patho 10.3 % (DF = 1.66), AV 2.7 % (DF = 2.63) and HOS 3.1 % (DF = 2.34). With the exception of HOS (CP: 5.0 % (DF = 2.23); TE: 4.7 % (DF = 2.12); Up 1 + 2: 8.0 % (DF = 2.16); Up 1: 4.3 % (DF = 1.69)), the investigated parameters were not substantially influenced by the dilution with the different extenders (day 0). However, overall semen quality of the diluted semen samples decreased continuously during the observation period of ten days. Chilling of ejaculates caused a significant reduction of motility (VW, GM_{CASA}, VW_{CASA}), a significant slowing down of sperm velocity and a significant decrease in viability (Lebende, Via_{CASA}), whereas in almost all diluted ejaculates there was a slight, but significant increase in pathomorphology and a significant augmentation in the proportion of sperm cells with acrosomal changes. Starting from an initial VW of 77.8 ± 11.4 % (CP) / 77.2 ± 14.3 % (TE) / 73.8 ± 18.0 % (Up 1 + 2) / 75.8 ± 13.8 % (Up 1) immediately after dilution (day 0), after ten days there was still a VW of 58.2 ± 22.1 % (CP) / 49.3 ± 23.9 % (TE) / 3.5 ± 4.6 % (Up 1 + 2) / 16.2 ± 12.1 % (Up 1). Via_{CASA} on day 0 was 84.3 % (71.4-93.8 %) (CP) / 83.6 % (69.6-93.9 %) (TE) / 75.2 % (57.0-89.6 %) (Up 1 + 2) / 85.1 % (76.5-92.0 %) (Up 1) and decreased during the observation period to 58.8 % (41.7-74.9 %) (CP) / 59.7 % (40.8-77.3 %) (TE) / 37.7 % (22.2-54.6 %) (Up 1 + 2) / 68.0 % (57.6-77.5 %) (Up 1) on day 10. In contrast, Patho increased from day 0 (CP: 7.4 % (DF = 2.21); TE: 8.2 % (DF = 1.93); Up 1 + 2: 7.9 % (DF = 2.08); Up 1: 9.3 % (DF = 1.72)) to day 10 (CP: 10.7 % (DF = 2.04); TE: 10.7 % (DF = 2.19); Up 1 + 2: 9.8 % (DF = 2.26); Up 1: 10.6 % (DF = 1.96)) and also for AV, there was with the exception of the ejaculates diluted with Up 1 + 2 an increase from day 0 (CP: 4.2 % (DF = 2.43); TE: 3.9 % (DF = 2.67); Up 1 + 2: 6.6 % (DF = 2.18); Up 1: 2.8 % (DF = 2.34)) to day 10 (CP: 7.6 % (DF = 2.57); TE: 8.5 % (DF = 2.14); Up 1 + 2: 4.0 % (DF = 2.72); Up 1: 8.2 % (DF = 1.78)). These results show that in the ejaculates diluted with CP and TE, an acceptable semen quality could be maintained for a storage period of ten days. During the observation period, motility (VW, GM_{CASA}, VW_{CASA}) and sperm velocity were significantly higher in samples extended with CP than in samples extended with the other extenders tested. Regarding viability (Lebende, Via_{CASA}) over time,

the Up 1 extender proved to be significantly superior to the other extenders. Concerning pathomorphology, the Up 1 + 2 extender was significantly better than the CP extender and the latter in turn significantly better than the TE extender. With regard to the acrosomal changes, significantly better results could be obtained with the Up 1 extender than with the CP extender. However, overall semen quality and in particular motility was best preserved in the CP extender, even if the differences to the other extenders tested were not significant for all the parameters. Due to these results, the extender CP seems to be superior to the other extenders tested and is therefore recommended for chilling of canine semen at 4°C.

However, as in the present study it remained unclear to what extent the fertility of the chilled, extended semen changes over time and what effects the extenders tested have on preservation of the fertilizing capacity of the sperm cells, further studies are necessary to characterize the preservation of the fertilizing capacity in vivo and in vitro.

8 Literaturverzeichnis

Alhaider, A. K., Watson, P. F. (2009)
Cryopreservation of dog semen: The effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium
Anim. Reprod. Sci. 110 (1-2), 147-161

Althouse, G. C., Ko, J. C., Hopkins, S. M., Evans, L. E. (1991)
Effect of latex and vinyl examination gloves on canine spermatozoal motility
J. Am. Vet. Med. Assoc. 199 (2), 227-229

Amann, R. P. (1989)
Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?
J. Androl. 10 (2), 89-98

Amann, R. P., Hammerstedt, R. H. (1980)
Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm
Biol. Reprod. 23 (3), 647-656

Amann, R. P., Hammerstedt, R. H. (1993)
In vitro evaluation of sperm quality: An opinion
J. Androl. 14 (6), 397-406

Amann, R. P., Katz, D. F. (2004)
Reflections on CASA after 25 years
J. Androl. 25 (3), 317-325

Andersen, K. (1975)
Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique
Zuchthygiene 10 (1), 1-4

Andersen, K. (1980)
Artificial insemination and storage of canine semen
in: Morrow, D. A. (Hrsg.): Current therapy in theriogenology: Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals
Verlag Saunders, Philadelphia, London, 661-665

Aurich, C., Spergser, J. (2007)
Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa
Theriogenology 67 (5), 912-918 [Abstract]

Bartlett, D. J. (1962a)
Studies on dog semen, I. Morphological characteristics
J. Reprod. Fertil. 3 (2), 173-189

Bartlett, D. J. (1962b)
Studies on dog semen, II. Biochemical characteristics
J. Reprod. Fertil. 3 (2), 190-205

Beccaglia, M., Anastasi, P., Chigioni, S., Luvoni, G. C. (2009a)
TRIS-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen
Reprod. Dom. Anim. 44, Suppl. 2, 345-349

Beccaglia, M., Anastasi, P., Luvoni, G. C. (2009b)
Freezing of canine semen in an animal-free protein extender
Vet. Res. Commun. 33, Suppl. 1, 77-80

Beletti, M. E., da Fontoura Costa, L., Viana, M. P. (2005)
A spectral framework for sperm shape characterization
Comput. Biol. Med. 35 (6), 463-473

Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M. L., Barrière, P., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D. (2010)
Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins)
Anim. Reprod. Sci. 119 (3-4), 305-313

Bergeron, A., Manjunath, P. (2006)
New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk
Mol. Reprod. Dev. 73 (10), 1338-1344

Bergeron, A., Brindle, Y., Blondin, P., Manjunath, P. (2007)
Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage
Biol. Reprod. 77 (1), 120-126

Bouchard, G. F., Morris, J. K., Sikes, J. D., Youngquist, R. S. (1990)
Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility
Theriogenology 34 (1), 147-157

Boucher, J. H., Foote, R. H., Kirk, R. W. (1958)
The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves
Cornell Vet. 48, 67-86

Brittain, D., Concannon, P. W., Flanders, J. A., Flahive, W. J., Lewis, B. L., Meyers-Wallen, V., Moise, N. S. (1995)
Use of surgical intrauterine insemination to manage infertility in a colony of research German Shepherd dogs
Lab. Anim. Sci. 45 (4), 404-407

Brochart, M., Coulomb, J. (1952)
Recherches sur la dilution et la conservation du sperme de Chien
Bull. Acad. Vet. Fr. 1952 (Février), 59-62

Burgess, C. M., Bredl, J. C. S., Plummer, J. M., England, G. C. W. (2001)
Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation
J. Reprod. Fertil. 57, Suppl., 357-363

Cain, J. L. (2001)
An overview of canine reproduction services. Getting started
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 31 (2), 209-218

Campbell, R. C., Dott, H. M., Glover, T. D. (1956)
Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa
J. Agric. Sci. 48, 1-8

Ceylan, A., Serin, I. (2007)
Influence of ascorbic acid addition to the extender on dog sperm motility, viability and acrosomal integrity during cooled storage
Revue Méd. Vét. 158 (7), 384-387

Christiansen, I. J. (1984a)
Reproduction in the Dog: Chapter 6: Artificial breeding and embryo transfer
in: Christiansen, I. J.: Reproduction in the Dog and Cat
Verlag Baillière Tindall, London, Philadelphia, 115-123

Christiansen, I. J. (1984b)
Reproduction in the Dog: Chapter 4: Andrology of the normal male
in: Christiansen, I. J.: Reproduction in the Dog and Cat
Verlag Baillière Tindall, London, Philadelphia, 80-109

Concannon, P. W., Battista, M. (1989)
Canine semen freezing and artificial insemination
in: Kirk, R. W. (Hrsg.): Current veterinary therapy X: Small animal practice
Verlag Saunders, Philadelphia, London, 1247-1258

Correa, J. R., Zavos, P. M. (1994)
The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane
Theriogenology 42 (2), 351-360

Cortes, C. J., Codelia, V. A., Manosalva, I., de Lange, J., De Los Reyes, M., Moreno, R. D. (2006)
Proacrosin/acrosin quantification as an indicator of acrosomal integrity in fresh and frozen dog spermatozoa
Anim. Reprod. Sci. 93 (1-2), 165-175

Dahlbom, M., Andersson, M., Vierula, M., Alanko, M. (1997)
Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: Work in progress
Theriogenology 48 (4), 687-698

De los Reyes, M., Palomino, J., de Lange, J., Anguita, C., Barros, C. (2009)
In vitro sperm penetration through the zona pellucida of immature and in vitro matured oocytes using fresh, chilled and frozen canine semen
Anim. Reprod. Sci. 110 (1-2), 37-45

Doak, R. L., Hall, A., Dale, H. E. (1967)
Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch
J. Reprod. Fertil. 13 (1), 51-58

Dott, H. M., Foster, G. C. A. (1979)
The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer
J. Reprod. Fertil. 55 (1), 161-166

Dunphy, B. C., Kay, R., Barrat, C. L. R., Cooke, I. D. (1989)
Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise
J. Androl. 10 (5), 378-385

Eder, S., Franz, C., Mueller, K. (2009)
Computer assisted motility analysis (SpermVision) of epididymal spermatozoa from domestic cat
in: 7th International Conference on Behaviour, Physiology and Genetics of Wildlife; Berlin, 2009 [Poster]
[Internet: URL: http://www.izw-berlin.de/en/research/fg4/index.html?news.html~rechts]

Eilts, B. E. (2005a)
Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation
Theriogenology 64 (3), 685-691

Eilts, B. E. (2005b)
Theoretical aspects of canine semen cryopreservation
Theriogenology 64 (3), 692-697

Ellington, J., Scarlett, J., Meyers-Wallen, V., Mohammed, H. O., Surman, V. (1993)
Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements
Theriogenology 40 (4), 725-733

England, G. C. W. (1993)
Cryopreservation of dog semen: A review
J. Reprod. Fertil. 47, Suppl., 243-255

England, G. C. W. (1999)
Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation
Theriogenology 52 (6), 981-986

England, G. C. W., Allen, W. E. (1992)
Factors affecting the viability of canine spermatozoa, II. Effects of seminal plasma and blood
Theriogenology 37 (2), 373-381

England, G. C. W., Millar, K. M. (2008)
The ethics and role of AI with fresh and frozen semen in dogs
Reprod. Dom. Anim. 43, Suppl. 2, 165-171

England, G. C. W., Plummer, J. M. (1993)
Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa
J. Reprod. Fertil. 47, Suppl., 261-270

England, G. C. W., Ponzio, P. (1996)
Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen
Theriogenology 46 (1), 165-171

Eulenberger, K., Schäfer-Somi, S., Aurich, C. (2009)
Effect of different concentrations of ascorbic acid on motility, membrane integrity and chromatin status of frozen-thawed canine spermatozoa within six hours of storage at 37°C
Reprod. Dom. Anim. 44, Suppl. 2, 354-358

Farrell, P. B., Presicce, G. A., Brockett, C. C., Foote, R. H. (1998)
Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility
Theriogenology 49 (4), 871-879

Farstad, W. (1984)
Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen
J. Small Anim. Pract. 25 (9), 561-565

Farstad, W. (1996)
Semen cryopreservation in dogs and foxes
Anim. Reprod. Sci. 42 (1-4), 251-260

Farstad, W. (2000)
Assisted reproductive technology in canid species
Theriogenology 53 (1), 175-186

Farstad, W. (2009)
Cryopreservation of canine semen - new challenges
Reprod. Dom. Anim. 44, Suppl. 2, 336-341

Farstad, W., Andersen Berg, K. (1989)
Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog
J. Reprod. Fertil. 39, Suppl., 289-292

Fetterolf, P. M., Rogers, B. J. (1990)
Prediction of human sperm penetrating ability using computerized motion parameters
Mol. Reprod. Dev. 27 (4), 326-331 [Abstract]

Fielden, E. D. (1971)
Artificial insemination in the dog
N. Z. Vet. J. 19 (8), 178-184

Fontbonne, A., Badinand, F. (1993)
Canine artificial insemination with frozen semen: Comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen
J. Reprod. Fertil. 47, Suppl., 325-327

Foote, R. H. (1964a)
The effects of electrolytes, sugars, glycerol, and catalase on survival of dog sperm stored in buffered-yolk mediums
Am. J. Vet. Res. 25, 32-36

Foote, R. H. (1964b)
The influence of frequency of semen collection, fractionation of the ejaculate, and dilution rate on the survival of stored dog sperm
Cornell Vet. 54, 89-97

Foote, R. H., Leonard, E. P. (1964)
The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders
Cornell Vet. 54, 78-89

Fougner, J. A., Aamdal, J., Andersen, K. (1973)
Intrauterine insemination with frozen semen in the blue fox
Nord. Vet. Med. 25 (3), 144-149

Freshman, J. L. (2002)
Semen collection and evaluation
Clin. Tech. Small Anim. Pract. 17 (3), 104-107

Froman, D. P., Amann, R. P., Riek, P. M., Olar, T. T. (1984)
Acrosin activity of canine spermatozoa as an index of cellular damage
J. Reprod. Fertil. 70 (1), 301-308

Futino, D. O., Mendes, M. C., Matos, W. N., Mondadori, R. G., Lucci, C. M. (2010)
Glycerol, methylformamide and dimethylformamide in canine semen cryopreservation
Reprod. Dom. Anim. 45 (2), 214-220

Garner, D. L., Johnson, L. A. (1995)
Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide
Biol. Reprod. 53 (2), 276-284

Gill, H. P., Kaufman, C. F., Foote, R. H., Kirk, R. W. (1970)
Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen
Am. J. Vet. Res. 31 (10), 1807-1813

Goodman, M. F., Cain, J. L. (1993)
Retrospective evaluation of artificial insemination with chilled extended semen in the dog
J. Reprod. Fertil. 47, Suppl., 554 [Abstract]

Griveau, J. F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J. P., Le Lannou, D. (1995)
Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa
J. Reprod. Fertil. 103 (1), 17-26

Gröpper, B. (2004)
Einflüsse unterschiedlicher Verfahren zur Sperma-Tiefgefrierkonservierung auf Motilität und Membranintegrität von Hundespermien - Einsatz moderner spermatologischer Analyseverfahren
Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss., 155

Günzel, A. R. (1986)
Zur Spermagewinnung, -beurteilung und –konservierung sowie Samenübertragung beim Hund
Tierärztl. Prax. 14 (2), 275-282

Günzel-Apel, A. R. (2007)
Künstliche Besamung beim Hund
in: Busch, W., Waberski, D. (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren Verlag Schattauer, Stuttgart, 262-281

Günzel-Apel, A. R., Günther, C., Terhaer, P., Bader, H. (1993)
Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa
J. Reprod. Fertil. 47, Suppl., 271-278

Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. (1990)
Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive
J. Androl. 11 (1), 73-88

Hansen, C., Vermeiden, T., Vermeiden, J. P., Simmet, C., Day, B. C., Feitsma, H. (2006)
Comparison of FACSCount AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen
Theriogenology 66 (9), 2188-2194

Harrison, R. A. P., Vickers, S. E. (1990)
Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa
J. Reprod. Fertil. 88 (1), 343-352

Harrop, A. E. (1954)
Artificial insemination of a bitch with preserved semen
Br. Vet. J. 110, 424-425

Harrop, A. E. (1956)
A review of canine artificial insemination
J. Am. Vet. Med. Assoc. 129 (12), 564-567

Heape, W. (1897)
The artificial insemination of mammals and subsequent possible fertilisation or impregnation of their ova
in: Taylor, R. (Hrsg.): Proceedings of the Royal society of London
Cambridge University Press, London, Vol. 61, 52-63

Hermansson, U., Linde-Forsberg, C. (2006)
Freezing of stored, chilled dog spermatozoa
Theriogenology 65 (3), 584-593

Hermansson, U., Ponglowhapan, S., Linde-Forsberg, C., Ström Holst, B. (2006)
A short sperm-oocyte incubation time ZBA in the dog
Theriogenology 66 (4), 717-725

Hewitt, D. A., Leahy, R., Sheldon, I. M., England, G. C. W. (2001)
Cryopreservation of epididymal dog sperm
Anim. Reprod. Sci. 67 (1-2), 101-111

Hoffmann, B. (2003a)
Samengewinnung und Beurteilung
in: Hoffmann, B.: Andrologie - Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung
Verlag Lehmanns Media, Berlin, 5-18

Hoffmann, B. (2003b)
Samenbeurteilung
in: Hoffmann, B.: Andrologie - Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung
Verlag Lehmanns Media, Berlin, 19-28

Hoffmann, B. (2003c)
Pathomorphologie der Samenzelle
in: Hoffmann, B.: Andrologie - Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung
Verlag Lehmanns Media, Berlin, 59-62

Hoffmann, B. (2003d)
Künstliche Besamung (KB)
in: Hoffmann, B.: Andrologie - Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung
Verlag Lehmanns Media, Berlin, 85-106

Hoogewijs, M., De Vliegher, S., Govaere, J., De Schauwer, C., Van Soom, A., de Kruif, A. (2011)
Analysing stallion semen: Factors affecting CASA outcomes
Reprod. Dom. Anim. 46, Suppl. 3, 70 [Abstract]

Hori, T., Kaseki, H., Fukuhara, Y., Oba, H., Mizutani, T., Kawakami, E., Tsutsui, T. (2006)
Effects of addition of sodiumlaurylsulfate on frozen-thawed canine spermatozoa
J. Vet. Med. Sci. 68 (10), 1125-1128

Iguer-Ouada, M., Verstegen, J. P. (2001a)
Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis
Theriogenology 55 (3), 733-749

Iguer-Ouada, M., Verstegen, J. P. (2001b)
Long-term preservation of chilled canine semen: Effect of commercial and laboratory prepared extenders
Theriogenology 55 (2), 671-684

Iguer-Ouada, M., Verstegen, J. P. (2001c)
Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis
Theriogenology 55 (5), 1143-1158

Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., Zaneveld, L. J. D. (1984)
Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics
J. Reprod. Fertil. 70 (1), 219-228

Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Zaneveld, L. J. D. (1992)
The hypoosmotic swelling test: An update
Arch. Androl. 29 (2), 105-116

Johnston, S. D. (1991)
Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 21 (3), 545-551

Kibble, R. M. (1969)
Artificial insemination in dogs
Austr. Vet. J. 45 (4), 194-199

Kmenta, I., Strohmayer, C., Müller-Schlösser, F., Schäfer-Somi, S. (2011)
Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa
Theriogenology 75 (6), 1095-1103

Koderle, M., Aurich, C., Schäfer-Somi, S. (2009)
The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog spermatozoa
Theriogenology 72 (9), 1215-1220

Kumi-Diaka, J. (1993)
Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test
Theriogenology 39 (6), 1279-1289

Kumi-Diaka, J., Badtram, G. (1994)
Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: In vitro bioassay for canine semen
Theriogenology 41 (7), 1355-1366

Kuster, C. (2005)
Sperm concentration determination betweeen hemacytometric and CASA systems: Why they can be different
Theriogenology 64 (3), 614-617

Kutzler, M. A. (2005)
Semen collection in the dog
Theriogenology 64 (3), 747-754

Lechniak, D., Kedzierski, A., Stanislawski, D. (2002)
The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro
Reprod. Dom. Anim. 37 (6), 379-380

Linde-Forsberg, C. (1991)
Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 21 (3), 467-485

Linde-Forsberg, C. (1995)
Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog
Seminars Vet. Med. Surg. (Small Anim.) 10 (1), 48-58

Linde-Forsberg, C. (2001)
Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen
in: Concannon, P. W., England, G., Verstegen, J., Linde-Forsberg, C. (Hrsg.): Recent Advances in Small Animal Reproduction
[Internet: URL: http://www.ivis.org: International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA]

Linde-Forsberg, C. (2005)
Artificial insemination
in: Proceedings ESAVS: Reproduction in companion, exotic and laboratory animal; Nantes, 2005

Linde-Forsberg, C., Forsberg, M. (1989)
Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen
J. Reprod. Fertil. 39, Suppl., 299-310

Linde-Forsberg, C., Forsberg, M. (1993)
Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs
J. Reprod. Fertil. 47, Suppl., 313-323

Linde-Forsberg, C., Ström Holst, B., Govette, G. (1999)
Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study
Theriogenology 52 (1), 11-23

Lopes, B. V., Cunha, I. C. N., Silva, J. F. S., Vidal Junior, M. V., Vianna, A. P. (2008)
Canine chilled semen: Influence of latex and air
in: Proceedings of the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction & 6th Biannual European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress; Vienna, 2008
[Internet: URL: http://www.ivis.org: International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA]

Lopes, G., Simões, A., Ferreira, P., Martins-Bessa, A., Rocha, A. (2009a)
Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers
Anim. Reprod. Sci. 112 (1-2), 158-163

Lopes, K. R. F., Costa, L. L. M., Lima, G. L., Souza, A. L. P., Silva, A. R. (2009b)
Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen
Theriogenology 72 (5), 650-654

Macpherson, J. W., Penner, P. (1967)
Canine reproduction, I. Reaction of animals to collection of semen and insemination procedures
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 31 (3), 62-64

Martikainen, P., Sannikka, E., Suominen, J., Santti, R. (1980)
Glucose content as a parameter of semen quality
Arch. Androl. 5 (4), 337-343

Martins-Bessa, A., Rocha, A., Mayenco-Aguirre, A. (2006)
Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders
Theriogenology 66 (9), 2047-2055

Michael, A. J., Alexopoulos, C., Pontiki, E. A., Hadjipavlou-Litina, D. J., Saratsis, P., Ververidis, H. N., Boscos, C. M. (2008)
Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation
Theriogenology 70 (5), 827-835

Michael, A. J., Alexopoulos, C., Pontiki, E. A., Hadjipavlou-Litina, D. J., Saratsis, P., Ververidis, H. N., Boscos, C. M. (2009)
Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa
Anim. Reprod. Sci. 112 (1-2), 119-135

Michael, A. J., Alexopoulos, C., Pontiki, E. A., Hadjipavlou-Litina, D. J., Saratsis, P., Ververidis, H. N., Boscos, C. M. (2010)
Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa
Reprod. Dom. Anim. 45 (2), 201-207

Mickelsen, W. D., Memon, M. A., Anderson, P. B., Freeman, D. A. (1993)
The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch
Theriogenology 39 (2), 553-560

Mogas, T., Rigau, T., Piedrafita, J., Bonet, S., Rodríguez-Gil, J. E. (1998)
Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen
Theriogenology 50 (8), 1171-1189

Morton, D. B., Bruce, S. G. (1989)
Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs
J. Reprod. Fertil. 39, Suppl., 311-316

Nishiyama, T., Kinugasa, T., Kimura, T., Watanabe, G., Taya, K., Tsumagari, S., Takeishi, M. (1999)
Determination of optimal time for mating by artificial insemination with chilled semen using luteinizing hormone surge as an indicator in beagles
J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 35 (4), 348-352

Niżański, W. (2006)
Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: Use of an infusion pipette and the Osiris catheter
Theriogenology 66 (2), 470-483

Niżański, W. (2009)
Artificial insemination in dogs: Use of chilled vs cryopreserved semen
Reprod. Dom. Anim. 44, Suppl. 3, 63 [Abstract]

Niżański, W., Klimowicz, M. (2005)
Zastosowanie barwienia flourescencyjnego SYBR-14/jodek propydyny i cytometrii przepływowej w ocenie jakości nasienia psów poddanego konserwacji w stanie płynnym (Use of fluorescent staining SYBR-14/propidium iodide and flow cytometry in evaluating the quality of chilled dog semen)
Med. weter. 61 (9), 1022-1028

Niżański, W., Klimowicz, M., Partyka, A., Savic, M., Dubiel, A. (2009)
Effects of the inclusion of Equex STM into Tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5°C
Reprod. Dom. Anim. 44, Suppl. 2, 363-365

Nöthling, J. O., Gerstenberg, C., Volkmann, D. H. (1997)
Semen quality after thawing: Correlation with fertility and fresh semen quality in dogs
J. Reprod. Fertil. 51, Suppl., 109-116

Oettlé, E. E. (1986)
Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen
Anim. Reprod. Sci. 12 (2), 145-150

Oettlé, E. E. (1993)
Sperm morphology and fertility in the dog
J. Reprod. Fertil. 47, Suppl., 257-260

Oettlé, E. E., Soley, J. T. (1988)
Sperm abnormalities in the dog: A light and electron microscopic study
Vet. Med. Rev. 59, 28-70

Ohl, D. A., Denil, J., Cummins, C., Menge, A. C., Seager, S. W. (1994)
Electroejaculation does not impair sperm motility in the beagle dog: A comparative study of electroejaculation and collection by artificial vagina
J. Urol. 152 (3), 1034-1037

Olar, T. T., Amann, R. P., Pickett, B. W. (1983)
Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog
Biol. Reprod. 29 (5), 1114-1120

Peña, A. I., Barrio, F., Quintela, L. A., Herradón, P. G. (1998a)
Effects of sodiumdodecylsulphate on post-thaw dog semen quality during in vitro incubation at 39°C and 22°C
Reprod. Dom. Anim. 33 (6), 393-398

Peña, A. I., Quintela, L. A., Herradón, P. G. (1998b)
Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry
Theriogenology 50 (8), 1211-1220

Peña, A., Johannisson, A., Linde-Forsberg, C. (1999)
Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry
Theriogenology 52 (6), 965-980

Peña, A., Linde-Forsberg, C. (2000)
Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa
Theriogenology 54 (6), 859-875

Peña, A. I., Johannisson, A., Linde-Forsberg, C. (2001)
Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation
J. Reprod. Fertil. 57, Suppl., 371-376

Peña, A. I., López-Lugilde, L., Barrio, M., Becerra, J. J., Quintela, L. A., Herradón, P. G. (2003a)
Studies on the intracellular Ca^{2+} concentration of thawed dog spermatozoa: Influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating conditions
Reprod. Dom. Anim. 38 (1), 27-35

Peña, A. I., Lugilde, L. L., Barrio, M., Herradón, P. G., Quintela, L. A. (2003b)
Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca^{2+} concentration of dog spermatozoa
Theriogenology 59 (8), 1725-1739

Peña, F. J., Núñez-Martínez, I., Morán, J. M. (2006)
Semen technologies in dog breeding: An update
Reprod. Dom. Anim. 41, Suppl. 2, 21-29

Peña Martínez, A. I. (2004)
Canine fresh and cryopreserved semen evaluation
Anim. Reprod. Sci. 82-83, 209-224

Pesch, S., Schuler, G., Wilhelm, E., Hoffmann, B. (2007)
Samengewinnung, -konservierung und künstliche Besamung beim Hund
Tierärztl. Prax. 35 (K), 81-90

Pinto, C. R. F., Eilts, B. E., Paccamonti, D. L. (1998)
The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches
Theriogenology 50 (2), 301-305

Pinto, C. R. F., Paccamonti, D. L., Eilts, B. E. (1999)
Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen
Theriogenology 52 (4), 609-616

Pinto, C. R. F., Kozink, D. M. (2008)
Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa
Anim. Reprod. Sci. 104 (2-4), 450-455

Ponglowhapan, S., Essén-Gustavsson, B., Linde Forsberg, C. (2004)
Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen
Theriogenology 62 (8), 1498-1517

Pretzer, S. D., Lillich, R. K., Althouse, G. C. (2006)
Single, transcervical insemination using frozen-thawed semen in the Greyhound: A case series study
Theriogenology 65 (6), 1029-1036

Province, C. A., Amann, R. P., Pickett, B. W., Squires, E. L. (1984)
Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C
Theriogenology 22 (4), 409-415

Pursel, V. G., Schulman, L. L., Johnson, L. A. (1978)
Effect of Orvus ES paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm
J. Anim. Sci. 47 (1), 198-202

Riesenbeck, A., Völger, D., Hoffmann, B. (2001)
Praxisnahe Bestimmung von Vitalitätsparametern zur Beurteilung von Rüdensperma
Tierärztl. Prax. 29 (K), 116-120

Rigau, T., Farré, M., Ballester, J., Mogas, T., Peña, A., Rodríguez-Gil, J. E. (2001)
Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates
Theriogenology 56 (5), 801-815

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A. (2002a)
Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa
Theriogenology 57 (6), 1669-1681

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A. (2002b)
Use of the sperm quality analyzer (SQA II-C) for the assessment of dog sperm quality
Reprod. Dom. Anim. 37 (3), 158-163

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A. (2003)
Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer
Theriogenology 60 (8), 1553-1568

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Hoflack, G., Maes, D., de Kruif, A. (2004a)
Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer
Theriogenology 62 (7), 1292-1306

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., Verberckmoes, S., de Kruif, A. (2004b)
Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa
Theriogenology 61 (7-8), 1589-1602

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D., de Kruif, A. (2005)
New techniques for the assessment of canine semen quality: A review
Theriogenology 64 (3), 706-719

Rodríguez-Gil, J. E., Montserrat, A., Rigau, T. (1994)
Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa
Theriogenology 42 (5), 815-829

Rohloff, D., Laiblin, C., Heidrich, S. (1978)
Untersuchungen über die Gefrierschutzwirkung von Glycerin und DMSO bei der Tiefgefrierung von Rüdensperma
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91 (2), 31-33

Root Kustritz, M. V. (2007)
The value of canine semen evaluation for practitioners
Theriogenology 68 (3), 329-337

Root Kustritz, M. V., Olson, P. N., Johnston, S. D., Root, T. K. (1998)
The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa
J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 34 (4), 348-352

Rota, A., Ström, B., Linde-Forsberg, C. (1995)
Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C
Theriogenology 44 (6), 885-900

Rota, A., Ström, B., Linde-Forsberg, C., Rodriguez-Martinez, H. (1997)
Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C
Theriogenology 47 (5), 1093-1101

Rota, A., Iguer-Ouada, M., Verstegen, J., Linde-Forsberg, C. (1999a)
Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste
Theriogenology 51 (6), 1045-1058

Rota, A., Peña, A. I., Linde-Forsberg, C., Rodriguez-Martinez, H. (1999b)
In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chloretetracycline assay and changes in motility patterns
Anim. Reprod. Sci. 57 (3-4), 199-215

Rota, A., Frishling, A., Vannozzi, I., Camillo, F., Romagnoli, S. (2001)
Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing
J. Reprod. Fertil. 57, Suppl., 377-381

Rota, A., Milani, C., Cabianca, G., Martini, M. (2006)
Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation
Theriogenology 65 (9), 1848-1858

Rota, A., Milani, C., Romagnoli, S., Zucchini, P., Mollo, A. (2010)
Pregnancy and conception rate after two intravaginal inseminations with dog semen frozen either with 5 % glycerol or 5 % ethylene glycol
Anim. Reprod. Sci. 118 (1), 94-97

Schäfer, S., Holzmann, A., Arbeiter, K. (1997)
Untersuchungen zur Transmigrationsrate von kurzzeitkonserviertem Hundesperma
Reprod. Dom. Anim. 32 (6), 285-289

Schäfer-Somi, S. (2009)
Use of chilled semen in dogs
Reprod. Dom. Anim. 44, Suppl. 3, 63 [Abstract]

Schäfer-Somi, S., Aurich, C. (2007)
Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution
Anim. Reprod. Sci. 102 (1-2), 1-13

Schäfer-Somi, S., Kluger, S., Knapp, E., Klein, D., Aurich, C. (2006)
Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa
Theriogenology 66 (2), 173-182

Seager, S. W. J. (1969)
Successful pregnancies utilizing frozen dog semen
A. I. Digest 17, 6-7

Seager, S. W. J., Fletcher, W. S. (1972)
Collection, storage, and insemination of canine semen
Lab. Anim. Sci. 22 (2), 177-182

Seager, S. W. J., Fletcher, W. S. (1973)
Progress on the use of frozen semen in the dog
Vet. Rec. 92 (1), 6-10

Seager, S. W. J., Platz, C. C. (1977a)
Artificial insemination and frozen semen in the dog
Vet. Clin. North Am. 7 (4), 757-764

Seager, S. W. J., Platz, C. C. (1977b)
Collection and evaluation of canine semen
Vet. Clin. North Am. 7 (4), 765-773

Seager, S. W. J., Platz, C. C., Fletcher, W. S. (1975)
Conception rates and related data using frozen dog semen
J. Reprod. Fertil. 45 (1), 189-192

Shah, S., Nagano, M., Yamashita, Y., Hishinuma, M. (2010)
Microencapsulation of canine sperm and its preservation at 4°C
Theriogenology 73 (5), 560-567

Shahiduzzaman, A. K. M., Linde-Forsberg, C. (2007)
Induced immotility during long-term storage at + 5°C does not prolong survival of dog spermatozoa
Theriogenology 68 (6), 920-933

Silva, L. D. M., Verstegen, J. P. (1995)
Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa
Theriogenology 44 (4), 571-579

Silva, L. D. M., Onclin, K., Snaps, F., Verstegen, J. (1995)
Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch
Theriogenology 43 (3), 615-623

Silva, L. D. M., Onclin, K., Lejeune, B., Verstegen, J. P. (1996)
Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen
Vet. Rec. 138 (7), 154-157

Silva, A. R., Cardoso, R. C. S., Uchoa, D. C., Silva, L. D. M. (2002)
Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing
Vet. J. 164 (3), 244-246

Silva, A. R., Cardoso, R. C. S., Silva, L. D. M. (2006)
Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen
Reprod. Dom. Anim. 41 (1), 74-78

Sirivaidyapong, S., Cheng, F. P., Marks, A., Voorhout, W. F., Bevers, M. M., Colenbrander, B. (2000)
Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm
Theriogenology 53 (3), 789-802

Sirivaidyapong, S., Ursem, P., Bevers, M. M., Colenbrander, B. (2001)
Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa
J. Reprod. Fertil. 57, Suppl., 383-386

Smith, S. C., England, G. C. W. (2001)
Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured using computer-aided sperm analysis
J. Reprod. Fertil. 57, Suppl., 151-159

Soderberg, S. F. (1986)
Canine breeding management
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 16 (3), 419-433

Ström Holst, B., Larsson, B., Linde-Forsberg, C., Rodriguez-Martinez, H. (2000)
Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay
J. Reprod. Fertil. 119 (2), 201-206

Ström Holst, B., Larsson, B., Rodriguez-Martinez, H., Lagerstedt, A.-S., Linde-Forsberg, C. (2001)
Zona pellucida binding assay - a method for evaluation of canine spermatozoa
J. Reprod. Fertil. 57, Suppl., 137-140

Strzeżek, R., Fraser, L. (2009)
Characteristics of spermatozoa of whole ejaculate and sperm-rich fraction of dog semen following exposure to media varying in osmolality
Reprod. Biol. 9 (2), 113-126

Thacker, D. L., Almquist, J. O. (1953)
Diluters for bovine semen, I. Fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk
J. Dairy Sci. 36 (2), 173-180

Theret, M., Treize, G., Dumon, C. (1987)
Artificial insemination of the bitch, using the Osiris gun
Mod. Vet. Pract. 68, 229-230

Thomassen, R., Farstad, W. (2009)
Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation
Theriogenology 71 (1), 190-199

Thomassen, R., Farstad, W., Krogenaes, A., Fougner, J. A., Andersen Berg, K. (2001)
Artificial insemination with frozen semen in dogs: A retrospective study
J. Reprod. Fertil. 57, Suppl., 341-346

Thomassen, R., Sanson, G., Krogenaes, A., Fougner, J. A., Berg, K. A., Farstad, W. (2006)
Artificial insemination with frozen semen in dogs: A retrospective study of 10 years using a non-surgical approach
Theriogenology 66 (6-7), 1645-1650

Tsutsui, T., Hase, M., Hori, T., Ito, T., Kawakami, E. (2000)
Effects of Orvus ES paste on canine spermatozoal longevity after freezing and thawing
J. Vet. Med. Sci. 62 (5), 533-535

Tsutsui, T., Hori, T., Yamada, A., Kirihara, N., Kawakami, E. (2003a)
Intratubal insemination with fresh semen in dogs
J. Vet. Med. Sci. 65 (5), 659-661

Tsutsui, T., Tezuka, T., Mikasa, Y., Sugisawa, H., Kirihara, N., Hori, T., Kawakami, E. (2003b)
Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature
J. Vet. Med. Sci. 65 (3), 307-312

Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., Ulguim, R. R., Alvarenga, M. V., Bianchi, I., Correa, M. N., Lucia, T., Jr., Deschamps, J. C. (2009)
Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen
Anim. Reprod. Sci. 115 (1-4), 323-327

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. (2002)
Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice
Theriogenology 57 (1), 149-179

Verstegen, J. P., Onclin, K., Iguer-Ouada, M. (2005)
Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: In vitro and in vivo studies
Theriogenology 64 (3), 720-733

Waberski, D., Petrounkina, A., Weitze, K. F., Töpfer-Petersen, E. (1999)
In-vitro-Beurteilung von Sperma zur Vorhersage der Fertilität
Tierärztl. Prax. 27 (G), 1-7

Wales, R. G., White, I. G. (1958)
The interaction of pH, tonicity and electrolyte concentration on the motility of dog spermatozoa
J. Physiol. 141 (2), 273-280

Watson, P. F., Morris, G. J. (1987)
Cold shock injury in animal cells
Symp. Soc. Exp. Biol. 41, 311-340

Weitze, K. F. (2001)
Prinzipien der Verdünnung und Konservierung
in: Busch, W., Holzmann A. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Andrologie - Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren
Verlag Schattauer, Stuttgart, 511-517

Weitze, K. F., Petrunkina, A. M. (2007)
Samenkonservierung, biochemische Grundlagen und Prinzipien der Einfrier- und Auftautechniken
in: Busch, W., Waberski, D. (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren Verlag Schattauer, Stuttgart, 119-131

WHO (World Health Organization) (2010)
WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen
5. Aufl., WHO Press, Switzerland, 61

Wijchman, J. G., de Wolf, B. T. H. M., Graaff, R., Arts, E. G. J. M. (2001)
Variation in semen parameters derived from computer-aided semen analysis, within donors and between donors
J. Androl. 22 (5), 773–780

Wilson, M. S. (1993)
Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen
J. Reprod. Fertil. 47, Suppl., 307-311

Wilson, M. S. (2001)
Transcervical insemination techniques in the bitch
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 31 (2), 291-304

Witte, T. S., Schäfer-Somi, S., Kuchar, A., Möstl, E., Iben, C., Aurich, C. (2009)
Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa
Anim. Reprod. Sci. 110 (3-4), 293-305

Yamashiro, H., Narita, K., Sugimura, S., Han, Y. J., Sugawara, A., Morohaku, K., Nakazato, F., Konno, T., Yoshida, M., Sato, E. (2007)
Trehalose enhanced the freezability of poodle dog sperm collected by an artificial vagina (AV)
Anim. Reprod. Sci. 102 (1-2), 165-171

Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., Tekeli, T. (2000)
Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing
Theriogenology 54 (4), 579-585

Yu, I., Leibo, S. P. (2002)
Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C
Theriogenology 57 (3), 1179-1190

9 Anhang

9.1 Geräte

- Waage: Mettler-Toledo GmbH, Typ PJ 300
- Magnetrührer: Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Typ MR 2000
- Wärmeschrank: Memmert GmbH & Co. KG
- Wärmebad: Memmert GmbH & Co. KG, Typ WNB 45
- Wärmeplatte: Helmut Hund GmbH, Typ HT 200
- Heiztisch: Minitüb GmbH, Typ HT 200
  (beheizte Arbeitsplatte und Mikroskopiertisch)
- Zentrifuge: Heraeus Christ, Labofuge I
- Kühlschränke:
  - Miele & Cie. KG, Typ KD 14505
  - Bauknecht Hausgeräte GmbH, Typ Bauknecht ***
- Bechergläser: Schott North America, Inc.
- Tulpengläser: Minitüb GmbH
- Erythrozytenmischpipette nach Thoma: MAGV GmbH
- Neubauer-Zählkammer: Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH
- Deckgläser, optisch plan geschliffen, für Hämozytometer, 20 x 26 mm:
  Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG (Menzel-Gläser®)
- Zentrifugenröhrchen: Schott North America, Inc.
- Pipetten:
  - Eppendorf AG, Eppendorf-Pipette 20 µl
  - Eppendorf AG, Eppendorf-Pipette 100 µl
  - Eppendorf AG, Eppendorf-Pipette 1000 µl
  - Rainin Instrument LLC, Pipet-Lite LTS 0,5 - 10 µl
- Mikroskope:
  - Leica Microsystems GmbH, Leica CM E
  - Helmut Hund GmbH, hund H 500
    (Phasenkontrastmikroskop mit Heiztisch)
- Zählgerät: Karl Hecht GmbH & Co KG, „Assistent“ Counter 345/15, Typ AC-15 PC
- SpermVision™:
  - Mikroskop: Olympus Deutschland GmbH Standard-Labormikroskop BX 41
  - Hochgeschwindigkeits-schwarz/weiß-Digitalkamera, Farbbildkamera

- Rechner: Pentium® 4D (Dual Core) Computer mit 3.0 GHz Prozessor und Betriebssystem Microsoft Windows XP Professional, Vista comp. Grafikkarte, 19“ TFT-Monitor
- SpermVision™-Softwarepaket (Version 3.5.6.2. – Juli 2009)

9.2 Analyseeinstellungen des SpermVision™-Systems

SpermVision™ Version 3.5.6.2. – Juli 2009,
Benutzerhandbuch Manual 12049/0586
Einstellung: RUDE TG

Motilitätsanalyse

- Probenschichtdicke:	20 µm
- Pixel zu µm Verhältnis:	168 zu 100
- Spermienerkennung:	Fläche von 20 bis 60 μm^2
- Zählkriterien:	4000 Spermien oder 8 Felder (Konzentrationsmessung: 8 Felder)
- Punkte bei der Spermienbewegung:	11
- Level 1-Klassifizierung:	
- unbewegliche Spermien:	AOC < 9,5° (Darstellungsfarbe rotbraun)
- lokalbewegliche Spermien:	DSL < 6,0 µm (Darstellungsfarbe gelb)
- vorwärtsbewegliche Spermien:	AOC ≥ 9,5° und DSL ≥ 6,0 µm, d. h. jede Zelle, die nicht als „unbeweglich“ oder „lokalbeweglich“ eingestuft wurde. (Darstellungsfarbe hellgrün)

- Level 2-Klassifizierung:

  Die Level 2-Klassifizierung wird bei der Untersuchung der vorwärtsbeweglichen Spermien angewendet.

- hyperaktive Spermien:	VCL > 118 µm/s, ALH > 6,5 µm und LIN < 0,5 (Darstellungsfarbe blau)

- lineare Spermien: STR > 0,9 und LIN > 0,5 (Darstellungsfarbe hellgrün)
- nicht lineare Spermien: STR ≤ 0,9 und LIN ≤ 0,5 (Darstellungsfarbe hellblau)
- kurvilineare Spermien: DAP/Radius ≥ 3 und LIN < 0,5 (Darstellungsfarbe weiß)

<u>Viabilitätsanalyse</u>

- Probenschichtdicke: 20 µm
- Pixel zu µm Verhältnis: 108 zu 100
- Spermienerkennung: grüne Fläche: 20 bis 600 µm^2; rote Fläche: 10 bis 800 µm^2
- Maximale Fläche der einzelnen Zelle: grün: 150 µm^2; rot: 200 µm^2
- Zählkriterien: 4000 Spermien oder 30 Felder
- Darstellungsfarbe intakte Spermien: hellblau
- Darstellungsfarbe geschädigte Spermien: gelb

<u>Sonstige Einstellungen</u>

- erlaubte Standardabweichung: 15 %
- Lichteinstellung bei Motilitätsanalyse: 80 bis 110
- Volumen pro Messkammer: 2,5 µl
- Analysetemperatur: 37°C
- Framerate (Bildfrequenz): 60 Frames/s
- Volumen von SYBR-14/PI pro Tube: 2,5 µl
- Inkubationszeit: 10 Minuten

9.3 Verbrauchsmaterialien

- Leja® Standard Count 4 Chamber Slide, 20 µm: Leja Products B. V.
- Pipettenspitzen 10 µl, farblos: Sarstedt AG & Co.
- Pipettenspitzen 200 µl, gelb: Sarstedt AG & Co.
- Pipettenspitzen 1000 µl, blau: Sarstedt AG & Co.
- bioclean™ Precision Pipette Tips: Rainin Instrument LLC

- Objektträger, 76x26x1 mm, Kanten geschnitten, ohne Mattrand: Interessengemeinschaft der Laborfachhändler GmbH & Co KG
- Deckgläser, 18x18 mm: Karl Hecht GmbH & Co KG
- pH-Indikatorpapier, pH 5,4 - 7,0 Spezialindikator: Merck KGaA
- Parafilm®: Pechiney Plastic Packaging
- Safe-Lock Tubes à 0,5 ml, braun: Eppendorf AG
- Eppendorf-Reaktionsgefäße à 1,5 ml: Eppendorf AG
- BRAUN Injekt® 5 ml Einwegspritzen: B. Braun Melsungen AG
- BD Falcon™ Konisches Röhrchen, 15 ml,: BD

9.4 Chemikalien

- Citronensäure-Monohydrat, krist. Reinst — Merck KGaA
  $C_6H_8O_7*H_2O$ M = 210,14 g/mol
- D(-)-Fruktose, > 99,5 %, für die Biochemie — Carl Roth GmbH & Co. KG
  $C_6H_{12}O_6$ M = 180,16 g/mol — (Art.-Nr.: 4981.1)
- Eosin B (bläulich) (C. I. 45400) — Merck KGaA
  $C_{20}H_6Br_2N_2Na_2O_9$ M = 624,10 g/mol
- Equex — Tierarztpraxis Dr. K. & C. Blendinger
- Frische Eier aus Freilandhaltung, Güteklasse A — Gut Frielingshof, Inter-ovo GmbH
- Glycerol ReagentPlus™, ≥ 99 %, G7757 – 500 ml — Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (L 7011) — Invitrogen™ - Molecular Probes™
  COMPONENT A: SYBR® 14 dye reagent (100 µl)
  1 mM solution in DMSO
  COMPONENT B: propidium iodide (5 ml)
  2,4 mM solution in water
- Spermac Stain™, Sperm Morphology Kit — FertilPro N. V.
  50 ml Fixative, 3 x 50 ml Stain A, B, C
- TRIS Ultra Qualität, PUFFERAN® ≥ 99,9 % — Carl Roth GmbH & Co. KG
  Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan — (Art.-Nr.: 5429.3)
  $C_4H_{11}NO_3$ M = 121,14 g/mol

9.5 Rezepte der verwendeten Medien

9.5.1 Rezepte der Verdünner

9.5.1.1 TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner für flüssigkonservierten Hundesamen (Linde-Forsberg, 2001)

TRIS	3,025 g
Zitronensäure	1,7 g
Fruktose	1,25 g
Aqua dest.	ad 100 ml
Eigelb	20 ml
Benzylpenicillin	1 mg/ml
Dihydrostreptomycinsulfat	1 mg/ml

9.5.1.2 Uppsala-Verdünner für die Kryokonservierung von Hundesamen (Linde-Forsberg, 2001)

Uppsala Equex-2 System

<u>Verdünner 1</u>

TRIS	3,025 g
Zitronensäure	1,7 g
Fruktose	1,25 g
Streptomycin	0,1 g
Aqua dest.	ad 77 ml
Benzylpenicillin	0,06 g (in 0,3 ml Aqua dest.)
Glycerol	3 ml
Eigelb	20 ml

Die Osmolarität beträgt 865 mOsm, der pH 6,72.

<u>Verdünner 2</u>

TRIS	3,025 g
Zitronensäure	1,7 g
Fruktose	1,25 g
Streptomycin	0,1 g
Aqua dest.	ad 72 ml
Benzylpenicillin	0,06 g (in 0,3 ml Aqua dest.)

Glycerol	7 ml
Equex	1 ml
Eigelb	20 ml

Die Osmolarität beträgt 1495 mOsm, der pH 6,74.

Auftaumedium

TRIS	3,025 g
Zitronensäure	1,7 g
Fruktose	1,25 g
Streptomycin	0,1 g
Aqua dest.	ad 100 ml
Benzylpenicillin	0,06 g (in 0,3 ml Aqua dest.)

Die Osmolarität beträgt 324 mOsm, der pH 6,76.

9.5.2 Zusammensetzung des Verdünners CaniPRO™ Chill 10 (Manual CaniPRO™ Chill 10, Minitüb)

- Reinstwasser
- Natriumzitrat
- TRIS
- Glukose
- Fruktose
- Herstellereigene Bestandteile
- Gentamicin

9.5.3 Rezepte diverser Gebrauchslösungen

9.5.3.1 Eosin-Färbelösung (Hoffmann, 2003b)

- 2 g Eosin-B
- 3 g Natriumzitrat
- ad 100 ml Aqua dest.

9.5.3.2 Hypoosmotische Lösung (150 mosmol) (Jeyendran et al., 1984; Riesenbeck et al., 2001; Hoffmann, 2003b)

- 0,735 g Natriumzitrat
- 1,351 g Fruktose
- ad 100 ml Aqua dest.

9.5.3.3 Färbelösung für die Viabilitätsanalyse

LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (Invitrogen™ - Molecular Probes™)

Herstellungsanleitung (nach Minitüb):

Die Komponenten der Färbelösung sind lichtempfindlich. Darauf sollte während der Herstellung und auch während der Lagerung Rücksicht genommen werden.

2,5 µl der Färbelösung bestehen aus:

- 1,2 µl Androhep®-Verdünner
- 0,05 µl SYBR-14
- 1,25 µl PI

Für die Herstellung werden 0,12 ml Androhep®-Verdünner mit 5 µl SYBR-14 und 0,125 ml PI gemischt. Das daraus entstehende Volumen von 0,25 ml wird anschließend auf 100 braune Eppendorf-Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes 0,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg) aufgeteilt, sodass sich in jedem Gefäß 2,5 µl der Färbelösung befinden. Bis zum Gebrauch sollte die Färbelösung bei -20°C aufbewahrt werden.

9.6 Herstellerangaben

Bauknecht Hausgeräte GmbH
Industriestr. 48
70565 Stuttgart, Deutschland

Tel.: 0711 / 81071-0
Fax: 0711 / 81071-3333
E-Mail:
bauknecht.de@bauknecht.com
Webseite: www.bauknecht.de

BD (Becton, Dickinson and Company)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417, USA

(Becton Dickinson GmbH
Tullastr. 8 – 12
69126 Heidelberg, Deutschland
Tel.: +49 (0) 6221 / 305-0
Fax: +49 (0) 6221 / 305-216)
Webseite: www.bd.com

Tierarztpraxis Dr. K. & C. Blendinger
Robert-Bosch-Str. 12
65719 Hofheim-Wallau, Deutschland

Tel.: 06122 / 535868-0
Fax: 06122 / 535868-45
E-Mail: info@blendivet.de
Webseite: www.blendivet.de

B. Braun Melsungen AG
Carl-Braun-Str. 1
34212 Melsungen, Deutschland
Postfach 1120
34209 Melsungen, Deutschland
Tel.: 05661 / 71-0
Fax: 05661 / 71-4567
Webseite: www.bbraun.de

Eppendorf AG
Barkhausenweg 1
22331 Hamburg, Deutschland
Tel.: +49 (0) 40 / 53801-0
Fax: +49 (0) 40 / 53801-556
E-Mail: eppendorf@eppendorf.de
Webseite: www.eppendorf.de

FertilPro N. V.
Industriepark Noord 32
8730 Beernem, Belgien
Tel.: +32 50 791805
Fax: +32 50 791799
E-Mail: info@fertipro.com
Webseite: www.fertipro.com

Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG
Stettener Str. 22-24
97647 Sondheim, Deutschland
Tel.: +49 (0) 9779 / 808-0
Fax: +49 (0) 9779 / 808-88
E-Mail: info@hecht-assistent.de
Webseite: www.hecht-assistent.de

Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Walpersdorfer Str. 12
91126 Schwabach, Deutschland
Tel.: +49 (0) 9122 / 9920-0
Fax: +49 (0) 9122 / 9920-65
E-Mail: sales@heidolph.de
Webseite: www.heidolph-instruments.de

Heraeus Holding GmbH
Heraeusstr. 12-14
Postfach 1561
63450 Hanau, Deutschland
Tel.: +49 (0) 6181 / 35-0
Fax: +49 (0) 6181 / 35-35 50
E-Mail: pr@heraeus.com
Webseite: www.heraeus.de

Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH
Rudorffweg 10
21031 Hamburg, Deutschland
Tel.: +49 (0) 40 / 739204-0
Fax: +49 (0) 40 / 7304148
E-Mail: hhh@herenz.de
Webseite: www.herenz.de

Helmut Hund GmbH Wilhelm-Will-Str. 7 35580 Wetzlar, Deutschland	Tel.: +49 (0) 6441 / 2004-0 Fax: +49 (0) 6441 / 2004-44 E-Mail: info@hund.de Webseite: www.hund.de
Interessengemeinschaft der Laborfachhändler GmbH & Co KG Robert-Bosch-Str. 3 61130 Nidderau, Deutschland	Tel.: 06187 / 93900
Inter-ovo GmbH Am Schloss 3 71686 Remseck, Deutschland	Tel.: 07146 / 28386
Invitrogen™ - Molecular Probes™ 29851 Willow Creek Road Eugene, OR 97402, USA	Tel.: (541) 465-8300 Fax: (541) 335-0504 Webseite: probes.invitrogen.com
Leica Microsystems GmbH Ernst-Leitz-Str. 17-37 35578 Wetzlar, Deutschland	Tel.: +49 (0) 6441 / 29-0 Fax: +49 (0) 64 41 / 29-2590 Webseite: www.leica-microsystems.com
Leja Products B. V. Luzernestraat 10 2153 GN Nieuw-Vennep, Niederlande	Tel.: +31 (0) 252-621848 Fax: +31 (0) 252-621806 Webseite: www.leja.nl
MAGV GmbH Laborbedarf und Laborgeräte Gießener Str. 48 35466 Rabenau, Deutschland	Tel.: 06407 / 90388 Fax: 06407 / 8727 E-Mail: Kontakt@MAGV-GmbH.de Webseite: www.magv-gmbh.de
Memmert GmbH & Co. KG Äußere Rittersbacher Str. 38 91126 Schwabach, Deutschland	Tel.: +49 (0) 9122 / 925-0 Fax: +49 (0) 9122 / 14585 E-Mail: sales@memmert.com Webseite: www.memmert.com

Gerhard Menzel,
Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG
Saarbrückener Str. 248
38116 Braunschweig, Deutschland
Tel.: +49 (0) 531 / 590080
Fax: +49 (0) 531 / 509799
Webseite: www.menzel.de

Merck KGaA
Frankfurter Str. 250
64293 Darmstadt, Deutschland
Tel.: +49 (0) 6151 / 72-0
Fax: +49 (0) 6151 / 72-2000
E-Mail: service@merck.de
Webseite: www.merck.de

Mettler-Toledo GmbH
Ockerweg 3
Postfach 110840
35353 Gießen, Deutschland
Tel.: +49 (0) 641 / 5070
Fax: +49 (0) 641 / 52951
Webseite: de.mt.com

Miele & Cie. KG
Carl-Miele-Str. 29
33332 Gütersloh, Deutschland
Postfach 33325 Gütersloh
Tel.: 05241 / 89-0
Fax: 05241 / 89-2090
E-Mail: info@miele.de
Webseite: www.miele.de

Minitüb GmbH
Hauptstr. 41
84184 Tiefenbach, Deutschland
Tel.: +49 (0) 8709 / 9229-0
Fax: +49 (0) 8709 / 9229-39
E-Mail: minitube@minitube.de
Webseite: www.minitube.de

Olympus Deutschland GmbH
Wendenstr. 14–18
20097 Hamburg, Deutschland
Tel.: +49 (0) 40 / 23773-0
Fax: +49 (0) 40 / 230817
E-Mail: info@olympus.de
mikroskopie@olympus.de
Webseite: www.olympus.de

Osram GmbH
Hellabrunner Str. 1
81543 München, Deutschland
Tel.: +49 (0) 89 / 6213-0
Fax: +49 (0) 89 / 6213-2020
E-Mail: webmaster@osram.com
Webseite: www.osram.de

Pechiney Plastic Packaging 289 River St Menasha, WI 54952, USA	Tel.: 920-727-6188 Webseite: www.pechineyplastic packaging.com
Rainin Instrument LLC 7500 Edgewater Drive P.O. Box 2160 Oakland, CA 94621-3027, USA	Ordering: 800-472-4646 Tel: 510-564-1600 Fax: 510-564-1727 Webseite: www.rainin.com
Carl Roth GmbH & Co. KG Schoemperlenstr. 1-5 76185 Karlsruhe, Deutschland Postfach 100121, 76231 Karlsruhe	Tel.: +49 (0) 721 / 5606-0 Fax: +49 (0) 721 / 5606-149 E-Mail: info@carlroth.de Webseite: www.carlroth.de
Sarstedt AG & Co. Sarstedtstraße Postfach 1220 51582 Nümbrecht, Deutschland	Tel.: +49 (0) 2293 / 305-0 Fax: +49 (0) 2293 / 305-282 E-Mail: info@sarstedt.com Webseite: www.sarstedt.com
Schott North America, Inc., Corporate Office 555 Taxter Road Elmsford, NY 10523, USA	Tel.: +1 (914) 831-2200 Fax: +1 (914) 831-2201 Webseite: www.us.schott.com
Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH Wunstorferstr. 40 30926 Seelze, Deutschland	Tel.: 05137 / 8238-0 Fax: 05137 / 8238-120 E-Mail: riedel@sial.com Webseite: www.sigmaaldrich.com
Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstr. 2 89555 Steinheim, Deutschland	Tel.: 07329 / 97-0 Fax: 07329 / 97-2160 E-Mail: Deorders@sial.com Webseite: www.sigmaaldrich.com

9.7 Verdünner zur Flüssigkonservierung von caninem Sperma

9.7.1 Milchverdünner

Tab. A1: Name, Zusammensetzung, pH-Wert und Osmolarität von milchbasierten Verdünnern für die Flüssigkonservierung von Hundesperma

Verdünner	Zusammensetzung	pH-Wert	Osmolarität (mOsmol/l)	Quellen
Magermilch-Verdünner	100 ml Magermilch, erhitzt auf 92-95°C für 10 Minuten und abgekühlt; Penicillin 500-1000 IU/ml; Streptomycin 1 mg/ml (Antibiotikazusatz nur bei Foote, 1964b und Province et al., 1984)	6,46 ± 0,02	277 ± 4	Foote, 1964b; Seager und Fletcher, 1972; Christiansen, 1984a; Province et al., 1984
Niedrig-Fett-Milchverdünner	homogenisierte, sterilisierte Milch mit 2 % Fett			Christiansen, 1984a
Vollmilch-Verdünner	homogenisierte, pasteurisierte Vollmilch, erhitzt auf 92-94°C für 10 Minuten und abgekühlt; Penicillin 1000 IU/ml; Dihydrostreptomycin 1000 µg/ml (Antibiotikazusatz nur bei Foote und Leonard, 1964 und Foote, 1964b)			Harrop, 1954; 1956; Bartlett, 1962a; Foote, 1964b; Foote und Leonard, 1964
Sahne-Verdünner	sterilisierte Sahne mit 9 % Fett			Foote und Leonard, 1964
Eigelb-Milch-Verdünner	pasteurisierte Milch (0,1 % Fett); Eigelb 20 %; Benzylpenicillin 1 mg/ml; Dihydrostreptomycinsulfat 1 mg/ml	6,56 ± 0,04	297 ± 3,35	Rota et al., 1995
Eigelb-Sahne-Verdünner	ultrahocherhitzte Sahne (12 % Fett); Eigelb 20 %; Benzylpenicillin 1 mg/ml; Dihydrostreptomycinsulfat 1 mg/ml	6,40 ± 0,02	308 ± 4,3	Rota et al., 1995
Sahne-Eigelb-Verdünner	homogenisierte, pasteurisierte Sahne (12 % Fett) 80 %; Eigelb 20 %; Benzylpenicillin 1000 IU/ml; Dihydrostreptomycin 1 mg/ml			Linde-Forsberg, 1991
Kenney-Verdünner bzw. NFDMS-G-(Non Fat Dried Milk Solid-Glucose)-Verdünner	Trockenmagermilch 24 g; Glukose 49 g; Natriumbikarbonat 13 g; Aqua bidest. ad 1000 ml	6,6	340	Bouchard et al., 1990; England und Ponzio, 1996; Schäfer et al., 1997

9.7.2 TRIS-gepufferte Eigelb-Verdünner

Tab. A2: Zusammensetzung, pH-Wert und Osmolarität verschiedener TRIS-gepufferter Eigelb-Verdünner für die Flüssigkonservierung von Hundesperma

TRIS	Zitronensäure-monohydrat	Natriumzitrat-monohydrat	Glukose	Fruktose	Dextrose	Aqua dest.	Glycerol	Eigelb	Antibiotika	pH-Wert	Osmolarität (mOsmol/l)	Quellen
2,4 g	1,3 g			1,0 g		72,2 ml	8,8 ml	20 ml	Penicillin 1000 IU/ml; Dihydrostreptomycin 1 mg/ml			Gill et al., 1970
Grundlage							8 %	20 %				Christiansen, 1984a
3,025 g	1,7 g			1,25 g		ad 77 ml	3 ml	20 ml	Benzylpenicillin 0,06 g; Streptomycin 0,1 g	6,72	865	Hermansson und Linde-Forsberg, 2006
2,4 g	1,4 g		0,8 g			80 ml		20 ml	Na-Benzylpenicillin 100000 IU; Streptomycinsulfat 0,1 g			Michael et al., 2008; 2009; 2010
2,44 g	1,36 g		0,82 g			ad 100 ml		20 %	Penicillin 500 IU/ml; Streptomycinsulfat 1 mg/ml	6,55 ± 0,02	301 ± 0,2	Province et al., 1984
3,025 g		1,7 g	1,25 g			100 ml		20 %	Benzylpenicillin 100 mg; Dihydrostreptomycinsulfat 100 mg	6,82	381	Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b; Verstegen et al., 2005; Varela Junior et al., 2009
3,025 g	1,7 g		(D-Glukose) 1,261 g			ad 100 ml		20 %	Benzylpenicillin 0,06 g; Dihydrostreptomycin 0,1 g	6,8	326	Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007
3,025 g	1,7 g		(D-Glukose) 1,275 g			ad 100 ml		20 %	Na-Benzylpenicillin 0,1 g; Streptomycinsulfat 0,1 g	6,05	330	Ponglowhapan et al., 2004
200 mM	60 mM		50 mM			ad 100 ml		20 %				Niżański et al., 2009
200 mM	(BSA 3 %) 63 mM		70 mM					20 %	Penicillin 1000 IU/ml; Dihydrostreptomycin 1 mg/ml			Peña et al., 2006
2,4 g	1,3 g			1,0 g		(bidest.) 80 ml		20 ml	Penicillin G-Kalium 100000 IU; Streptomycinsulfat 0,1 g			Tsutsui et al., 2003b
3,0 g	1,7 g			1,25 g		ad 100 ml		20 %	Benzylpenicillin 100 IU/ml; Dihydrostreptomycinsulfat 100 µg/ml			Nishiyama et al., 1999
3,025 g	1,7 g			1,25 g		ad 100 ml		20 %	Benzylpenicillin 1 mg/ml; Dihydrostreptomycinsulfat 1 mg/ml	6,68 ± 0,04	320,7 ± 28,3	Rota et al., 1995; Linde-Forsberg, 2001; Beccaglia et al., 2009a

3,025 g	1,7 g			1,25 g		(bidest.) ad 100 ml		20 %	Gentamicin 0,2 g	TRIS-Puffer: 6,7 Eigelb: 6,2	TRIS-Puffer: 324 Eigelb: 297	Kmenta et al., 2011
3,025 g	1,7 g			1,25 g		ad 80 ml		20 ml	Benzylpenicillin 0,06 g; Streptomycin 0,1 g	6,78	325	Hermansson und Linde-Forsberg, 2006
3,025 g		1,7 g		1,25 g		100 ml		20 %	Benzylpenicillin 100 mg; Dihydrostreptomycinsulfat 100 mg	6,84	364	Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b
3,025 g	1,7 g			(D-Fruktose) 1,275 g		ad 100 ml		20 %	Na-Benzylpenicillin 0,1 g; Streptomycinsulfat 0,1 g	6,06	332	Ponglowhapan et al., 2004
3,028 g	1,78 g			1,25 g		(bidest.) ad 100 ml		20 %	Streptomycin 0,1 g			Günzel, 1986; Günzel-Apel et al., 1993; Pesch et al., 2007
12,10 g	5,76 g				4,5 g			20 %	Natriumpenicillin 100000 IU; Streptomycin 200 g			Kumi-Diaka und Badtram, 1994

9.7.3 Sonstige Verdünner

Tab. A3: Name, Zusammensetzung, pH-Wert und Osmolarität sonstiger Verdünner für die Flüssigkonservierung von Hundesperma

Verdünner	Zusammensetzung in g/100 ml	pH-Wert	Osmolarität (mOsmol/l)	Quellen
Caprogen-Verdünner	Natriumzitratdihydrat 1,56 g; Glycin 0,78 g; Glukose 0,23 g; N-Kapronsäure (2,5 %ige Lsg.) 1,0 ml; Katalase (45 mg/100 ml Lsg.) 1,0 ml; Eigelb 20 ml; Penicillin 500 IU/ml; Streptomycinsulfat 1 mg/ml; unmittelbar vor dem Gebrauch für 15-20 Min. bei 5°C mit Stickstoffgas begast	6,97 ± 0,02	326 ± 0,02	Province et al., 1984
Zitrat-Eigelb-Verdünner	Natriumzitrat (2,9 % ige Lsg.) 80 %; Eigelb 20 %			Christiansen, 1984a
Eigelb-Zitrat-Glycin-Glukose-Verdünner	Zitronensäure 1,16 g; Glycin 0,75 g; Glukose 1,0 g; Eigelb 20 ml; Aqua bidest. 80 ml; Penicillin G-Kalium 100000 IU; Streptomycinsulfat 0,1 g			Tsutsui et al., 2003b
Eigelb-Zitrat-Glycin-Glukose-Verdünner	Natriumzitratdihydrat 1,45 g; Glycin 0,937 g; Glukose 1,25 g; Aqua bidest. ad 100 ml; Eigelb 20 %; Penicillin 1000 IU/ml; Dihydrostreptomycin 1000 µg/ml	6,6-6,8		Foote, 1964a; 1964b; Foote und Leonard, 1964
Eigelb-Natriumzitratdihydrat-Verdünner	Natriumzitratdihydrat 3,0 g; Eigelb 20 ml; Aqua bidest. 80 ml; Penicillin G-Kalium 100000 IU; Streptomycinsulfat 0,1 g			Tsutsui et al., 2003b
Cornell University (Zitrat-Bikarbonat-Eigelb-Verdünner)	Zitronensäuremonohydrat 0,07 g; Natriumbikarbonat 0,17 g; Natriumzitratdihydrat 1,16 g; Kaliumchlorid 0,03 g; Glycin 0,75 g; Glukose 0,24 g; Eigelb 20 ml; Penicillin 500 IU/ml; Streptomycinsulfat 1 mg/ml	6,75 ± 0,02	308 ± 5	Province et al., 1984
TRIS-BES-Verdünner	TRIS 0,43 g; BES 1,49 g; Laktose 3,4 g; Glukose 0,59 g; Aqua dest. 100 ml; Eigelb 20 %; Benzylpenicillin 100 mg; Dihydrostreptomycinsulfat 100 mg	6,81	310	Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b
EDTA-Verdünner	EDTA 0,37 g; Natriumbikarbonat 0,12 g; Glukose 6 g; Aqua dest. 100 ml; Eigelb 20 %; Benzylpenicillin 100 mg; Dihydrostreptomycinsulfat 100 mg	6,81	464	Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b
TRIS-Lecithin-Verdünner	TRIS 3,025 g; Zitronensäure 1,7 g; Fruktose 1,25 g; Aqua dest. ad 100 ml; Sojabohnen-Lecithin 0,04 %; Benzylpenicillin 1 mg/ml; Dihydrostreptomycinsulfat 1mg/ml			Beccaglia et al., 2009a
TRIS-Lecithin-Verdünner	TRIS 3,025 g; Zitronensäure 1,7 g; Fruktose 1,25 g; Aqua bidest. ad 100 ml; Lecithin 0,8 %; Gentamicin 0,2 g	TRIS-Puffer: 6,7 Lecithin: 6,6	TRIS-Puffer: 324 Lecithin: 337	Kmenta et al., 2011

9.7.4 Kommerzielle Verdünner

Tab. A4: Name, Zusammensetzung, pH-Wert und Osmolarität einiger kommerzieller Verdünner für die Flüssigkonservierung von Hundesperma

Verdünner	Zusammensetzung (soweit bekannt)	Hersteller	pH-Wert	Osmolarität (mOsmol/l)	Quellen
Biladyl (Tiefgefrierverdünner für Bullen-, Schafbock- und Ziegenbocksamen)		Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany	6,77 (6,66 mit 20 % Eigelb-zusatz)	418 (408 mit 20 % Eigelb-zusatz)	Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b www.minitube.de
CaniPRO™ Chill 5 (20 ml)	Reinstwasser; Natriumzitrat; TRIS; Glukose; Fruktose; herstellereigene Bestandteile; Gentamicin	Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany			www.minitube.de
CaniPRO™ Chill 10 (20 ml)	Reinstwasser; Natriumzitrat; TRIS; Glukose; Fruktose; herstellereigene Bestandteile; Gentamicin; erfordert den Zusatz von 4 ml frischem Eigelb	Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany			www.minitube.de
CaninePro®		Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany			Peña et al., 2006; Günzel-Apel, 2007
Canine-EXT™ Chilled Semen Extender	Pulver in Aqua bidest. auflösen und 20 ml Eigelb hinzufügen	Livestock Concepts, Inc., Hawarden, Iowa, USA			www.livestockconcepts.com
CLONE (Cryogenetic Laboratory Of New England) Chilled Semen Kit	Glukose, keine Fruktose und wahrscheinlich Eigelb und Antibiotika; Semen Enhancer und Semen Activator	CLONE (Cryogenetic Laboratory of New England) Inc., Chester Springs, PA, USA	6,9	268	Linde-Forsberg, 2001; Shahiduzzaman und Linde-Forsberg, 2007 www.cloneusa.com
Fresh Express® (10 ml)	patentrechtlich geschützt	Synbiotics Corporation, San Diego, CA, USA			Goodman und Cain, 1993; Nishiyama et al., 1999; Linde-Forsberg, 2001 www.synbiotics.com
Fresh-phos-Verdünner		IMV Technologies L'Aigle, France	6,82 (6,69 mit 20 % Eigelb-zusatz)	1220 (1156 mit 20 % Eigelb-zusatz)	Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b

Fresh Plus Verdünner	Eigelb-Zitrat-Verdünner; kommerzielles Puder aufgelöst in dest. Wasser und 3,5 % frischem Eigelb	Edwards Agri Sales Inc., Baraboo, WI, USA	6,3	255	Bouchard et al., 1990
Green-Verdünner		IMV Technologies L'Aigle, France	6,77 (6,84 mit 20 % Eigelb-zusatz)	425 (392 mit 20 % Eigelb-zusatz)	Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b
INSEMIN-AID Semen Extender		Camelot Farms, College Station, Texas, USA			www.camelotfarms.com
IVT (Illinois Variable Temperature)-Verdünner					Christiansen, 1984a
Kenney-Verdünner bzw. NFDMS-G-(Non Fat Dried Milk Solid-Glucose)-Verdünner	Trockenmagermilch 24 g; Glukose 49 g; Natriumbikarbonat 13 g; Aqua bidest. ad 1000 ml	Fa. Hamilton Thorn Research, Beverly, MA, USA	6,6	340	Bouchard et al., 1990; England und Ponzio, 1996; Schäfer et al., 1997
Magermilch Verdünner (Kenney-Typ) für Pferde	mit Ticarcillin oder Gentamicin	Lane Manu-facturing Inc., Denver, CO, USA			Pinto et al., 1999
Magermilch-Verdünner	Trockenmagermilch 2,4 g; Glukose 4,9 g; Natrium-hydrogencarbonat (8,4 %ige Lsg.) 1,6 ml; Aqua bidest. ad 100 ml				Günzel-Apel et al., 1993; Günzel-Apel, 2007
Kenney Skim Milk Canine Semen Extender Kit without antibiotics		Jeffers, Inc., Dothan, AL, USA			www.jefferspet.com
Canine Kenney Extender (10 ml, 100 ml)		Hamilton Research, Inc., South Hamilton, MA, USA			www.equitainer.com
Canine Semen Extender with Gentamicin (Kenney Magermilch-verdünner)		Veterinary Concepts™			www.veterinaryconcepts.com
Canine Semen Extender without Antibiotics (Kenney Magermilch-verdünner)		Veterinary Concepts™			www.veterinaryconcepts.com
Next Generation Dr. Kenney Canine Semen Extender		Exodus Breeders Corporation, York, PA, USA			www.exodusbreeders.com

Next Generation® Velocity™ Canine Semen Extender Next Generation Universal Canine Semen Extender	enthält Eigelb	Exodus Breeders Corporation, York, PA, USA Exodus Breeders Corporation, York, PA, USA			www.exodusbreeders.com www.exodusbreeders.com
Triladyl Canine® (45 ml) (Tiefgefrierverdünner)	TRIS-gepufferter Verdünner; vor Gebrauch müssen 10 ml Eigelb zugegeben werden	Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany			Günzel-Apel, 2007 www.minitube.de

9.8 Ergebnistabellen

Tab. A5: CASA-Motilitätsparameter DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, STR, LIN und WOB (n, $\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Nativsperma und in den verschiedenen Verdünnern an Tag 0

Verdünner	Parameter	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
keiner (Nativsperma) (n = 30)	DAP (µm)	41,6 ± 8,7	23,7	53,9
	DCL (µm)	61,9 ± 11,6	42,6	85,1
	DSL (µm)	35,1 ± 9,1	14,9	50,0
	VAP (µm/s)	97,4 ± 20,4	55,2	123,7
	VCL (µm/s)	144,9 ± 27,5	97,9	199,9
	VSL (µm/s)	82,5 ± 21,3	33,9	112,9
	ALH (µm)	5,7 ± 1,0	3,5	7,9
	BCF (Hz)	26,2 ± 3,4	20,5	34,5
	STR (VSL/VAP) (%)	83,4 ± 8,1	61,0	92,0
	LIN (VSL/VCL) (%)	56,6 ± 11,6	27,0	76,0
	WOB (VAP/VCL) (%)	67,0 ± 8,4	45,0	82,0
CP (n = 30)	DAP (µm)	38,8 ± 6,8	23,2	48,9
	DCL (µm)	54,4 ± 6,9	39,6	65,6
	DSL (µm)	32,4 ± 6,8	16,8	44,6
	VAP (µm/s)	90,9 ± 16,0	54,1	113,0
	VCL (µm/s)	127,0 ± 16,5	90,2	153,7
	VSL (µm/s)	76,2 ± 15,7	39,2	101,7
	ALH (µm)	5,2 ± 0,8	3,6	6,8
	BCF (Hz)	24,0 ± 2,7	19,7	30,6
	STR (VSL/VAP) (%)	82,9 ± 5,3	72,0	94,0
	LIN (VSL/VCL) (%)	59,3 ± 9,2	39,0	77,0
	WOB (VAP/VCL) (%)	70,9 ± 7,3	54,0	82,0
TE (n = 30)	DAP (µm)	37,3 ± 6,5	22,6	51,0
	DCL (µm)	54,0 ± 7,7	36,9	70,3
	DSL (µm)	30,4 ± 6,3	17,4	44,9
	VAP (µm/s)	87,8 ± 15,4	51,2	119,5
	VCL (µm/s)	126,8 ± 18,7	85,8	167,8

	VSL (µm/s)	71,8 ± 14,8	40,3	105,5
	ALH (µm)	5,4 ± 0,9	3,4	7,5
	BCF (Hz)	23,1 ± 2,4	19,7	29,7
	STR (VSL/VAP) (%)	81,1 ± 6,1	68,0	90,0
	LIN (VSL/VCL) (%)	56,2 ± 9,4	37,0	69,0
	WOB (VAP/VCL) (%)	68,6 ± 7,4	53,0	79,0
Up 1 + 2 (n = 12)	DAP (µm)	31,5 ± 5,4	23,8	40,3
	DCL (µm)	47,7 ± 5,6	41,1	56,5
	DSL (µm)	26,5 ± 5,8	17,4	37,2
	VAP (µm/s)	72,2 ± 12,6	52,7	89,5
	VCL (µm/s)	109,1 ± 13,8	90,3	131,4
	VSL (µm/s)	60,7 ± 13,1	40,9	82,5
	ALH (µm)	4,4 ± 0,6	3,4	5,4
	BCF (Hz)	24,9 ± 3,1	21,2	31,2
	STR (VSL/VAP) (%)	83,2 ± 5,6	73,0	92,0
	LIN (VSL/VCL) (%)	55,0 ± 8,5	42,0	68,0
	WOB (VAP/VCL) (%)	65,5 ± 6,4	57,0	74,0
Up 1 (n = 18)	DAP (µm)	35,4 ± 4,6	22,7	40,3
	DCL (µm)	52,2 ± 6,7	33,5	60,9
	DSL (µm)	28,0 ± 4,3	19,2	34,8
	VAP (µm/s)	83,8 ± 10,4	53,9	94,6
	VCL (µm/s)	123,1 ± 15,7	79,4	144,9
	VSL (µm/s)	66,3 ± 9,4	45,8	79,7
	ALH (µm)	5,5 ± 0,8	3,8	6,7
	BCF (Hz)	23,6 ± 2,7	19,5	29,1
	STR (VSL/VAP) (%)	78,8 ± 4,9	71,0	86,0
	LIN (VSL/VCL) (%)	53,8 ± 6,4	43,0	65,0
	WOB (VAP/VCL) (%)	67,7 ± 4,1	60,0	75,0

Tab. A6: Resultate der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner“ zum Vergleich der Verdünner CP (1), TE (2) und Up 1 + 2 (3) mit dem Nativsperma (0) unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0); n = 12; bei signifikantem Resultat wurde anschließend ein Student-Newman-Keuls-Test zum paarweisen Vergleich der Mittelwerte durchgeführt; die Ergebnisse werden getrennt nach den jeweils getesteten Paaren angegeben; n. s. = nicht signifikant, p < 0,01 = signifikant mit p < 0,01, p < 0,05 = signifikant mit p < 0,05

Parameter	Haupteffekt (p-Wert) Verdünner	Student-Newman-Keuls-Test
DAP	0,0017	0 – 1: n. s. 0 – 2: n. s. 0 – 3: p < 0,01 1 – 2: n. s. 1 – 3: p < 0,05 2 – 3: p < 0,05

DCL	0,0001	0 – 1: p < 0,05 0 – 2: p < 0,05 0 – 3: p < 0,01 1 – 2: n. s. 1 – 3: p < 0,05 2 – 3: p < 0,05
DSL	0,1	
VAP	0,0004	0 – 1: n. s. 0 – 2: n. s. 0 – 3: p < 0,01 1 – 2: n. s. 1 – 3: p < 0,01 2 – 3: p < 0,01
VCL	< 0,0001	0 – 1: p < 0,05 0 – 2: p < 0,05 0 – 3: p < 0,01 1 – 2: n. s. 1 – 3: p < 0,01 2 – 3: p < 0,01
VSL	0,04	0 – 1: n. s. 0 – 2: n. s. 0 – 3: p < 0,05 1 – 2: n. s. 1 – 3: n. s. 2 – 3: n. s.
ALH	0,0001	0 – 1: n. s. 0 – 2: n. s. 0 – 3: p < 0,01 1 – 2: n. s. 1 – 3: p < 0,01 2 – 3: p < 0,01
BCF	0,065	
STR	0,27	
LIN	0,68	
WOB	0,74	

Tab. A7: Resultate der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner" zum Vergleich der Verdünner CP (1), TE (2) und Up 1 (4) mit dem Nativsperma (0) unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0); n = 18; bei signifikantem Resultat wurde anschließend ein Student-Newman-Keuls-Test zum paarweisen Vergleich der Mittelwerte durchgeführt; die Ergebnisse werden getrennt nach den jeweils getesteten Paaren angegeben; n. s. = nicht signifikant, p < 0,01 = signifikant mit p < 0,01, p < 0,05 = signifikant mit p < 0,05

Parameter	Haupteffekt (p-Wert) Verdünner	Student-Newman-Keuls-Test
DAP	< 0,0001	0 – 1: p < 0,01 0 – 2: p < 0,01 0 – 4: p < 0,01 1 – 2: p < 0,05 1 – 4: p < 0,01 2 – 4: p < 0,01
DCL	< 0,0001	0 – 1: p < 0,01 0 – 2: p < 0,01 0 – 4: p < 0,01 1 – 2: n. s. 1 – 4: n. s. 2 – 4: n. s.
DSL	< 0,0001	0 – 1: p < 0,05 0 – 2: p < 0,01 0 – 4: p < 0,01 1 – 2: n. s. 1 – 4: p < 0,01 2 – 4: p < 0,01
VAP	< 0,0001	0 – 1: p < 0,01 0 – 2: p < 0,01 0 – 4: p < 0,01 1 – 2: n. s. 1 – 4: p < 0,01 2 – 4: p < 0,01
VCL	< 0,0001	0 – 1: p < 0,01 0 – 2: p < 0,01 0 – 4: p < 0,01 1 – 2: n. s. 1 – 4: n. s. 2 – 4: n. s.

VSL	< 0,0001	0 – 1: $p < 0,05$ 0 – 2: $p < 0,01$ 0 – 4: $p < 0,01$ 1 – 2: n. s. 1 – 4: $p < 0,01$ 2 – 4: $p < 0,01$
ALH	0,18	
BCF	< 0,0001	0 – 1: $p < 0,01$ 0 – 2: $p < 0,01$ 0 – 4: $p < 0,01$ 1 – 2: n. s. 1 – 4: n. s. 2 – 4: n. s.
STR	0,0006	0 – 1: n. s. 0 – 2: n. s. 0 – 4: $p < 0,01$ 1 – 2: n. s. 1 – 4: $p < 0,01$ 2 – 4: $p < 0,05$
LIN	0,0019	0 – 1: n. s. 0 – 2: n. s. 0 – 4: n. s. 1 – 2: n. s. 1 – 4: $p < 0,01$ 2 – 4: n. s.
WOB	0,0003	0 – 1: $p < 0,01$ 0 – 2: n. s. 0 – 4: n. s. 1 – 2: n. s. 1 – 4: $p < 0,01$ 2 – 4: $p < 0,05$

Tab. A8: Resultate der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors „Verdünner" zum Vergleich der Verdünner CP (1) und TE (2) mit dem Nativsperma (0) unmittelbar nach dem Verdünnen (Tag 0); n = 30; bei signifikantem Resultat wurde anschließend ein Student-Newman-Keuls-Test zum paarweisen Vergleich der Mittelwerte durchgeführt; die Ergebnisse werden getrennt nach den jeweils getesteten Paaren angegeben; n. s. = nicht signifikant, p < 0,01 = signifikant mit p < 0,01, p < 0,05 = signifikant mit p < 0,05

Parameter	Haupteffekt (p-Wert) Verdünner	Student-Newman-Keuls-Test
DAP	0,0002	0 – 1: p < 0,01 0 – 2: p < 0,01 1 – 2: n. s.
DCL	< 0,0001	0 – 1: p < 0,01 0 – 2: p < 0,01 1 – 2: n. s.
DSL	0,0026	0 – 1: p < 0,05 0 – 2: p < 0,01 1 – 2: n. s.
VAP	0,0001	0 – 1: p < 0,01 0 – 2: p < 0,01 1 – 2: n. s.
VCL	< 0,0001	0 – 1: p < 0,01 0 – 2: p < 0,01 1 – 2: n. s.
VSL	0,0022	0 – 1: p < 0,05 0 – 2: p < 0,01 1 – 2: n. s.
ALH	0,024	0 – 1: p < 0,05 0 – 2: n. s. 1 – 2: n. s.
BCF	< 0,0001	0 – 1: p < 0,01 0 – 2: p < 0,01 1 – 2: n. s.
STR	0,25	
LIN	0,21	
WOB	0,0094	0 – 1: p < 0,01 0 – 2: n. s. 1 – 2: n. s.

Tab. A9: CASA-Motilitätsparameter DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, STR, LIN und WOB (n, $\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in den verschiedenen Verdünnern im Zeitverlauf

Parameter	Verdünner	n	Tag	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
DAP (µm)	CP	30	0	38,8 ± 6,8	23,2	48,9
			1	38,5 ± 5,6	26,0	45,7
			2	38,2 ± 6,0	22,5	46,7
			3	37,1 ± 5,7	22,8	44,6
			5	36,9 ± 5,1	23,4	42,7
			7	35,6 ± 4,6	25,3	42,2
			10	32,3 ± 7,8	0,0	40,8
	TE	30	0	37,3 ± 6,5	22,6	51,0
			1	37,5 ± 5,6	24,2	46,3
			2	36,8 ± 5,5	22,2	44,8
			3	35,9 ± 5,1	23,5	44,3
			5	35,8 ± 4,4	22,4	43,4
			7	33,7 ± 6,1	10,3	40,5
			10	31,0 ± 6,7	9,0	38,8
	Up 1 + 2	12	0	31,5 ± 5,4	23,8	40,3
			1	30,5 ± 4,7	22,7	37,5
			2	29,0 ± 4,5	21,5	35,7
			3	25,6 ± 5,7	17,5	33,0
			5	24,7 ± 5,4	12,8	29,3
			7	18,6 ± 6,7	0,0	24,2
			10	13,3 ± 3,2	7,5	19,3
	Up 1	18	0	35,4 ± 4,6	22,7	40,3
			1	35,4 ± 6,3	21,6	54,0
			2	33,3 ± 7,2	17,2	51,6
			3	34,2 ± 10,1	15,3	57,4
			5	33,7 ± 9,4	20,8	53,8
			7	29,0 ± 8,9	19,6	47,3
			10	18,9 ± 4,6	11,1	28,3
DCL (µm)	CP	30	0	54,4 ± 6,9	39,6	65,6
			1	55,8 ± 5,2	41,7	63,5
			2	55,3 ± 6,1	37,8	64,3
			3	54,4 ± 6,4	38,0	69,2
			5	54,5 ± 7,4	31,7	71,6
			7	54,1 ± 5,9	37,3	70,0
			10	53,1 ± 12,1	0,0	70,9
	TE	30	0	54,0 ± 7,7	36,9	70,3
			1	56,0 ± 4,9	42,8	64,7
			2	55,1 ± 6,3	37,6	66,9
			3	54,1 ± 5,9	32,8	65,6
			5	54,4 ± 5,8	39,6	65,9
			7	52,5 ± 10,0	12,7	73,3
			10	50,3 ± 11,8	8,9	73,5
	Up 1 + 2	12	0	47,7 ± 5,6	41,1	56,5
			1	46,4 ± 4,4	38,7	52,5
			2	43,8 ± 5,1	35,3	51,6
			3	40,0 ± 6,5	29,3	48,8

			5	39,1 ± 10,4	13,6	51,7
			7	30,0 ± 11,8	0,0	41,8
			10	19,9 ± 6,9	9,7	34,4
	Up 1	18	0	52,2 ± 6,7	33,5	60,9
			1	53,5 ± 6,1	38,6	66,9
			2	51,3 ± 8,4	28,5	63,2
			3	51,1 ± 9,0	36,8	72,5
			5	50,7 ± 11,4	39,3	79,8
			7	44,5 ± 11,0	33,2	71,3
			10	32,9 ± 8,2	12,8	45,3
DSL (µm)	CP	30	0	32,4 ± 6,8	16,8	44,6
			1	31,5 ± 5,9	18,3	41,2
			2	31,4 ± 6,0	18,8	43,2
			3	30,5 ± 5,4	19,7	41,0
			5	30,6 ± 4,7	20,1	39,0
			7	29,4 ± 4,7	20,0	37,8
			10	26,4 ± 7,0	0,0	36,0
	TE	30	0	30,4 ± 6,3	17,4	44,9
			1	30,2 ± 6,1	17,6	42,0
			2	29,8 ± 5,6	18,8	40,6
			3	29,2 ± 4,9	20,0	39,4
			5	29,4 ± 4,4	19,5	38,7
			7	27,6 ± 5,6	9,2	35,2
			10	25,3 ± 5,8	7,9	33,9
	Up 1 + 2	12	0	26,5 ± 5,8	17,4	37,2
			1	24,8 ± 4,6	16,6	32,5
			2	23,9 ± 4,1	16,2	31,0
			3	20,6 ± 5,1	12,4	28,1
			5	20,1 ± 4,5	10,2	25,0
			7	15,0 ± 5,3	0,0	19,3
			10	10,8 ± 2,1	6,9	14,5
	Up 1	18	0	28,0 ± 4,3	19,2	34,8
			1	27,6 ± 7,2	17,0	51,8
			2	25,8 ± 7,3	13,5	48,2
			3	28,1 ± 10,9	11,7	53,9
			5	27,9 ± 10,3	16,0	49,6
			7	24,0 ± 9,0	15,4	43,6
			10	15,1 ± 3,9	10,0	24,0
VAP (µm/s)	CP	30	0	90,9 ± 16,0	54,1	113,0
			1	90,2 ± 13,6	58,6	106,5
			2	89,4 ± 14,1	52,2	105,0
			3	87,2 ± 13,7	52,8	103,1
			5	86,4 ± 12,2	54,4	99,3
			7	83,2 ± 10,4	58,3	97,1
			10	75,5 ± 17,9	0,0	94,7
	TE	30	0	87,8 ± 15,4	51,2	119,5
			1	88,1 ± 13,2	55,7	105,4
			2	86,2 ± 12,9	52,3	102,3
			3	84,0 ± 12,3	53,3	104,5
			5	83,8 ± 10,4	51,8	98,3
			7	79,0 ± 13,9	25,6	92,3

			10	73,1 ± 14,1	32,0	88,4
	Up 1 + 2	12	0	72,2 ± 12,6	52,7	89,5
			1	70,4 ± 11,1	52,9	85,2
			2	66,9 ± 11,1	50,4	82,5
			3	59,6 ± 13,0	41,4	76,6
			5	57,2 ± 12,4	26,4	66,6
			7	43,7 ± 15,8	0,0	55,8
			10	34,7 ± 6,3	23,0	45,5
	Up 1	18	0	83,8 ± 10,4	53,9	94,6
			1	83,6 ± 13,9	51,5	123,8
			2	78,5 ± 16,6	37,2	117,0
			3	80,1 ± 22,6	34,3	131,0
			5	79,1 ± 20,9	49,3	126,5
			7	68,1 ± 19,1	47,1	107,4
			10	45,4 ± 10,1	30,9	66,1
VCL (µm/s)	CP	30	0	127,0 ± 16,5	90,2	153,7
			1	130,3 ± 13,1	94,4	151,7
			2	129,0 ± 14,8	87,2	152,2
			3	127,4 ± 15,7	87,5	164,6
			5	127,3 ± 18,5	69,3	171,5
			7	126,4 ± 13,9	86,1	165,5
			10	123,8 ± 28,5	0,0	168,2
	TE	30	0	126,8 ± 18,7	85,8	167,8
			1	131,2 ± 12,6	97,9	152,7
			2	128,8 ± 15,2	87,8	159,2
			3	126,5 ± 14,4	77,5	156,5
			5	127,1 ± 14,5	87,4	155,6
			7	123,0 ± 23,4	32,1	176,2
			10	117,9 ± 26,8	31,5	177,0
	Up 1 + 2	12	0	109,1 ± 13,8	90,3	131,4
			1	106,8 ± 10,8	89,9	122,5
			2	100,5 ± 13,2	79,8	120,0
			3	92,6 ± 15,1	68,6	114,2
			5	90,0 ± 23,9	28,2	116,1
			7	69,6 ± 27,4	0,0	94,3
			10	50,9 ± 14,5	28,9	80,5
	Up 1	18	0	123,1 ± 15,7	79,4	144,9
			1	126,2 ± 14,2	91,0	154,4
			2	120,7 ± 20,6	61,8	147,2
			3	119,6 ± 20,2	86,9	168,5
			5	118,9 ± 25,5	92,7	182,5
			7	104,2 ± 23,6	79,8	162,4
			10	77,9 ± 17,3	35,5	102,8
VSL (µm/s)	CP	30	0	76,2 ± 15,7	39,2	101,7
			1	74,1 ± 13,8	43,2	96,0
			2	73,7 ± 13,8	44,1	97,1
			3	71,8 ± 12,7	45,6	94,5
			5	71,8 ± 10,7	47,1	88,0
			7	69,1 ± 10,6	48,4	86,3
			10	61,8 ± 16,0	0,0	84,9
	TE	30	0	71,8 ± 14,8	40,3	105,5

			1	71,3 ± 14,2	41,0	95,4
			2	70,0 ± 12,8	43,6	92,7
			3	68,5 ± 11,7	45,4	91,9
			5	68,9 ± 10,1	45,2	87,9
			7	64,9 ± 12,4	22,8	80,6
			10	59,8 ± 12,2	27,9	77,4
	Up 1 + 2	12	0	60,7 ± 13,1	40,9	82,5
			1	57,2 ± 10,7	38,7	73,9
			2	55,1 ± 9,7	38,1	71,4
			3	48,0 ± 11,7	30,2	63,8
			5	46,7 ± 10,2	21,1	56,0
			7	35,2 ± 12,4	0,0	43,8
			10	28,5 ± 3,7	21,2	34,2
	Up 1	18	0	66,3 ± 9,4	45,8	79,7
			1	65,4 ± 15,9	40,6	118,6
			2	61,1 ± 16,4	29,4	109,4
			3	65,8 ± 24,4	26,4	123,2
			5	65,7 ± 23,1	38,1	116,7
			7	56,4 ± 19,4	37,1	98,5
			10	36,5 ± 8,5	26,2	55,9
ALH (µm)	CP	30	0	5,2 ± 0,8	3,6	6,8
			1	5,5 ± 0,8	3,5	7,1
			2	5,4 ± 0,8	3,5	7,0
			3	5,4 ± 0,7	3,5	7,1
			5	5,3 ± 0,9	3,0	7,3
			7	5,3 ± 0,9	3,1	7,6
			10	5,2 ± 1,3	0,0	7,5
	TE	30	0	5,4 ± 0,9	3,4	7,5
			1	5,7 ± 0,8	3,7	7,1
			2	5,6 ± 0,8	3,9	7,4
			3	5,4 ± 0,8	3,2	7,2
			5	5,4 ± 0,8	3,5	7,3
			7	5,3 ± 1,0	1,9	7,5
			10	5,2 ± 0,9	3,4	7,5
	Up 1 + 2	12	0	4,4 ± 0,6	3,4	5,4
			1	4,8 ± 0,6	3,6	5,7
			2	4,6 ± 0,6	3,2	5,4
			3	4,6 ± 0,5	3,9	5,4
			5	4,6 ± 0,4	3,6	5,2
			7	4,0 ± 1,4	0,0	5,9
			10	4,2 ± 0,8	2,7	5,6
	Up 1	18	0	5,5 ± 0,8	3,8	6,7
			1	5,7 ± 0,8	3,4	6,8
			2	5,5 ± 1,1	2,2	7,0
			3	5,2 ± 0,8	2,9	6,0
			5	5,2 ± 0,5	4,3	5,9
			7	4,9 ± 0,5	4,2	6,0
			10	4,3 ± 0,7	2,4	5,3
BCF (Hz)	CP	30	0	24,0 ± 2,7	19,7	30,6
			1	22,3 ± 3,0	18,7	31,3
			2	22,6 ± 3,0	18,8	32,8

			3	22,8 ± 2,9	18,6	30,4
			5	23,1 ± 2,8	18,8	31,0
			7	23,0 ± 2,8	18,9	31,9
			10	22,2 ± 4,7	0,0	29,9
	TE	30	0	23,1 ± 2,4	19,7	29,7
			1	21,8 ± 2,6	18,7	29,7
			2	22,3 ± 2,8	18,7	31,7
			3	22,6 ± 2,9	19,0	32,3
			5	23,2 ± 3,4	19,4	35,4
			7	22,3 ± 3,6	7,5	29,2
			10	22,2 ± 3,7	6,3	28,6
	Up 1 + 2	12	0	24,9 ± 3,1	21,2	31,2
			1	21,8 ± 1,4	20,1	24,4
			2	21,5 ± 1,5	20,0	24,5
			3	20,3 ± 1,7	16,6	22,1
			5	20,0 ± 6,4	0,0	24,0
			7	18,6 ± 7,9	0,0	29,9
			10	15,9 ± 6,0	6,1	24,8
	Up 1	18	0	23,6 ± 2,7	19,5	29,1
			1	21,8 ± 3,2	19,7	33,0
			2	21,7 ± 2,7	19,5	28,7
			3	22,9 ± 4,0	19,7	34,7
			5	23,1 ± 3,2	20,0	30,5
			7	22,7 ± 2,8	18,5	29,3
			10	20,7 ± 4,7	10,2	33,0
STR (%)	CP	30	0	82,9 ± 5,3	72,0	94,0
			1	81,4 ± 6,0	66,0	93,0
			2	81,8 ± 5,4	70,0	92,0
			3	81,8 ± 5,0	70,0	92,0
			5	82,7 ± 5,8	68,0	94,0
			7	82,4 ± 5,9	67,0	93,0
			10	78,5 ± 15,9	0,0	92,0
	TE	30	0	81,1 ± 6,1	68,0	90,0
			1	80,0 ± 6,7	64,0	93,0
			2	80,5 ± 5,8	69,0	91,0
			3	81,0 ± 4,9	69,0	91,0
			5	81,8 ± 5,6	69,0	91,0
			7	81,6 ± 5,5	66,0	90,0
			10	81,5 ± 5,9	64,0	90,0
	Up 1 + 2	12	0	83,2 ± 5,6	73,0	92,0
			1	80,6 ± 4,2	73,0	88,0
			2	81,8 ± 4,8	75,0	93,0
			3	79,7 ± 3,8	72,0	88,0
			5	81,0 ± 3,0	77,0	87,0
			7	73,9 ± 23,5	0,0	86,0
			10	82,6 ± 8,1	65,0	93,0
	Up 1	18	0	78,8 ± 4,9	71,0	86,0
			1	77,1 ± 6,4	68,0	95,0
			2	76,9 ± 6,1	68,0	93,0
			3	80,2 ± 7,2	73,0	96,0
			5	81,0 ± 6,9	72,0	94,0

			7 10	81,3 ± 5,2 79,8 ± 4,5	73,0 71,0	92,0 91,0
LIN (%)	CP	30	0 1 2 3 5 7 10	59,3 ± 9,2 56,6 ± 9,5 56,8 ± 9,1 56,0 ± 8,5 56,6 ± 8,9 54,5 ± 8,8 48,2 ± 12,8	39,0 33,0 37,0 40,0 36,0 33,0 0,0	77,0 73,0 76,0 70,0 76,0 68,0 70,0
	TE	30	0 1 2 3 5 7 10	56,2 ± 9,4 53,8 ± 10,5 54,0 ± 9,1 54,0 ± 8,8 54,1 ± 7,8 53,1 ± 8,9 51,8 ± 11,1	37,0 32,0 37,0 37,0 36,0 33,0 29,0	69,0 74,0 73,0 72,0 67,0 71,0 88,0
	Up 1 + 2	12	0 1 2 3 5 7 10	55,0 ± 8,5 52,9 ± 6,2 54,2 ± 5,8 50,9 ± 6,1 53,1 ± 8,5 47,2 ± 16,7 58,1 ± 11,1	42,0 43,0 46,0 43,0 40,0 0,0 41,0	68,0 62,0 66,0 61,0 74,0 71,0 74,0
	Up 1	18	0 1 2 3 5 7 10	53,8 ± 6,4 50,9 ± 9,0 50,1 ± 9,7 53,4 ± 12,6 54,0 ± 9,8 52,8 ± 8,3 47,6 ± 10,5	43,0 40,0 38,0 27,0 38,0 37,0 32,0	65,0 76,0 76,0 77,0 73,0 69,0 79,0
WOB (%)	CP	30	0 1 2 3 5 7 10	70,9 ± 7,3 68,7 ± 7,7 68,7 ± 7,6 68,0 ± 7,3 67,7 ± 6,8 65,7 ± 6,9 58,8 ± 13,5	54,0 50,0 52,0 52,0 52,0 50,0 0,0	82,0 81,0 84,0 80,0 80,0 78,0 79,0
	TE	30	0 1 2 3 5 7 10	68,6 ± 7,4 66,6 ± 8,1 66,4 ± 7,3 66,1 ± 7,6 65,7 ± 6,2 64,4 ± 7,5 63,1 ± 10,1	53,0 50,0 52,0 52,0 52,0 49,0 46,0	79,0 81,0 79,0 80,0 77,0 79,0 100,0
	Up 1 + 2	12	0 1 2 3 5 7 10	65,5 ± 6,4 65,1 ± 5,3 65,9 ± 4,5 63,5 ± 5,6 65,1 ± 10,5 58,3 ± 19,9 69,6 ± 8,2	57,0 57,0 58,0 54,0 51,0 0,0 56,0	74,0 71,0 71,0 70,0 93,0 84,0 80,0

	Up 1	18	0	67,7 ± 4,1	60,0	75,0
			1	65,5 ± 6,4	56,0	80,0
			2	64,4 ± 7,5	53,0	81,0
			3	65,7 ± 10,6	36,0	81,0
			5	65,7 ± 7,4	52,0	77,0
			7	64,5 ± 6,6	51,0	76,0
			10	59,0 ± 10,1	40,0	86,0

Tab. A10: Resultate der zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich der Faktoren „Verdünner“ und „Zeit“ zum Vergleich der Verdünner CP und TE im Zeitverlauf (Tag 0-10) der Flüssigkonservierung bei 4°C für 10 Tage; n = 30

Parameter	Haupteffekte (p-Wert)		Wechselwirkung (p-Wert)
	Verdünner	Zeit	Verdünner x Zeit
geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CASA-Gesamtmotilität	0,32	< 0,0001	< 0,0001
CASA-Vorwärtsbeweglichkeit	0,011	< 0,0001	< 0,0001
DAP	< 0,0001	< 0,0001	0,89
DCL	0,011	0,0021	0,037
DSL	< 0,0001	< 0,0001	0,7
VAP	< 0,0001	< 0,0001	0,88
VCL	0,033	0,0012	0,059
VSL	< 0,0001	< 0,0001	0,72
ALH	0,0007	< 0,0001	0,062
BCF	0,0006	0,054	0,35
STR	0,24	0,28	0,073
LIN	0,016	< 0,0001	0,0012
WOB	0,094	< 0,0001	0,0035
Lebende Eosinausstrich	0,97	< 0,0001	0,41
CASA-Viabilität	0,2	< 0,0001	0,24
Pathomorphologie (gesamt)	0,015	< 0,0001	0,26
- Kopfveränderungen	0,68	0,92	0,4
- Halsveränderungen	0,19	0,47	0,34
- Schwanzveränderungen	0,012	< 0,0001	0,43
- aufgerollte Schwänze	0,33	0,0072	0,72
- Knickschwänze	0,99	0,03	0,85
- schleifenförmige Schwänze	0,014	< 0,0001	0,27
- lose Köpfe	0,75	0,23	0,67
- Plasmatropfen	0,83	0,72	0,7
Kopfkappenveränderungen (gesamt)	0,66	0,0006	0,81
- abgelöste Kopfkappen	0,14	0,001	0,0068
- schiefe Kopfkappen	0,14	0,0013	0,11
- sonstige Veränderungen	0,031	< 0,0001	0,91

Tab. A11: Resultate der zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich der Faktoren „Verdünner“ und „Zeit“ zum Vergleich der Verdünner CP und Up 1 + 2 im Zeitverlauf (Tag 0-10) der Flüssigkonservierung bei 4°C für 10 Tage; n = 12

Parameter	Haupteffekte (p-Wert)		Wechselwirkung (p-Wert)
	Verdünner	Zeit	Verdünner x Zeit
geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CASA-Gesamtmotilität	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CASA-Vorwärtsbeweglichkeit	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DAP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DCL	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DSL	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
VAP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
VCL	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
VSL	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
ALH	0,0001	0,0014	0,68
BCF	0,021	0,0003	0,066
STR	0,94	0,70	0,27
LIN	0,96	0,51	0,0092
WOB	0,83	0,30	0,0099
Lebende Eosinausstrich	0,57	< 0,0001	0,42
CASA-Viabilität	< 0,0001	< 0,0001	0,019
Pathomorphologie (gesamt)	0,53	0,0007	0,032
- Kopfveränderungen	0,24	0,53	0,73
- Halsveränderungen	0,83	0,84	0,48
- Schwanzveränderungen	0,032	0,0082	0,0034
- aufgerollte Schwänze	0,2	0,018	0,46
- Knickschwänze	0,85	0,62	0,26
- schleifenförmige Schwänze	0,0103	< 0,0001	0,12
- lose Köpfe	0,45	0,63	0,58
- Plasmatropfen	0,16	0,42	0,95
Kopfkappenveränderungen (gesamt)	0,99	0,062	0,35
- abgelöste Kopfkappen	0,59	0,29	0,77
- schiefe Kopfkappen	0,0997	0,14	0,99
- sonstige Veränderungen	0,22	0,18	0,065

Tab. A12: Resultate der zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich der Faktoren „Verdünner“ und „Zeit“ zum Vergleich der Verdünner CP und Up 1 im Zeitverlauf (Tag 0-10) der Flüssigkonservierung bei 4°C für 10 Tage; n = 18

Parameter	Haupteffekte (p-Wert)		Wechselwirkung (p-Wert)
	Verdünner	Zeit	Verdünner x Zeit
geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CASA-Gesamtmotilität	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CASA-Vorwärtsbeweglichkeit	0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DAP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DCL	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DSL	< 0,0001	< 0,0001	0,0013
VAP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
VCL	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
VSL	< 0,0001	< 0,0001	0,0019
ALH	0,17	< 0,0001	< 0,0001
BCF	0,41	0,0092	0,14
STR	0,0097	0,11	0,012
LIN	0,0015	< 0,0001	0,054
WOB	0,0005	< 0,0001	0,26
Lebende Eosinausstrich	0,019	< 0,0001	0,23
CASA-Viabilität	0,019	< 0,0001	0,042
Pathomorphologie (gesamt)	0,17	< 0,0001	0,85
- Kopfveränderungen	0,98	0,096	0,93
- Halsveränderungen	0,13	0,054	0,98
- Schwanzveränderungen	0,75	< 0,0001	0,44
- aufgerollte Schwänze	0,45	0,74	0,81
- Knickschwänze	0,24	0,0010	0,85
- schleifenförmige Schwänze	0,82	< 0,0001	0,52
- lose Köpfe	0,59	0,1005	0,31
- Plasmatropfen	0,032	0,013	0,18
Kopfkappenveränderungen (gesamt)	0,021	< 0,0001	0,92
- abgelöste Kopfkappen	0,80	0,0018	0,038
- schiefe Kopfkappen	0,043	< 0,0001	0,30
- sonstige Veränderungen	0,0025	< 0,0001	0,03

Tab. A13: Resultate der zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich der Faktoren „Verdünner“ und „Zeit“ zum Vergleich der Verdünner TE und Up 1 + 2 im Zeitverlauf (Tag 0-10) der Flüssigkonservierung bei 4°C für 10 Tage; n = 12

Parameter	Haupteffekte (p-Wert)		Wechselwirkung (p-Wert)
	Verdünner	Zeit	Verdünner x Zeit
geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CASA-Gesamtmotilität	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CASA-Vorwärtsbeweglichkeit	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DAP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DCL	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DSL	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
VAP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
VCL	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
VSL	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
ALH	0,0001	0,0003	0,70
BCF	0,042	0,0024	0,012
STR	0,95	0,69	0,092
LIN	0,70	0,51	0,17
WOB	0,84	0,36	0,38
Lebende Eosinausstrich	0,38	< 0,0001	0,045
CASA-Viabilität	0,0001	< 0,0001	0,063
Pathomorphologie (gesamt)	0,096	0,13	0,24
- Kopfveränderungen	0,24	0,94	0,40
- Halsveränderungen	0,50	0,78	0,76
- Schwanzveränderungen	0,0028	0,30	0,028
- aufgerollte Schwänze	0,098	0,13	0,32
- Knickschwänze	0,18	0,25	0,42
- schleifenförmige Schwänze	0,0022	< 0,0001	0,26
- lose Köpfe	0,13	0,41	0,83
- Plasmatropfen	0,37	0,44	0,16
Kopfkappenveränderungen (gesamt)	0,16	0,057	0,56
- abgelöste Kopfkappen	0,84	0,62	0,21
- schiefe Kopfkappen	0,97	0,14	0,50
- sonstige Veränderungen	0,64	0,73	0,37

Tab. A14: Resultate der zweifaktoriellen Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich der Faktoren „Verdünner“ und „Zeit“ zum Vergleich der Verdünner TE und Up 1 im Zeitverlauf (Tag 0-10) der Flüssigkonservierung bei 4°C für 10 Tage; n = 18

Parameter	Haupteffekte (p-Wert)		Wechselwirkung (p-Wert)
	Verdünner	Zeit	Verdünner x Zeit
geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CASA-Gesamtmotilität	0,0003	< 0,0001	< 0,0001
CASA-Vorwärtsbeweglichkeit	0,0045	< 0,0001	< 0,0001
DAP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DCL	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DSL	0,0004	< 0,0001	0,0007
VAP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
VCL	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
VSL	0,0002	< 0,0001	0,0007
ALH	0,028	< 0,0001	0,0006
BCF	0,64	0,022	0,078
STR	0,042	0,063	0,13
LIN	0,016	0,0044	0,32
WOB	0,0078	< 0,0001	0,53
Lebende Eosinausstrich	0,033	< 0,0001	0,91
CASA-Viabilität	0,54	< 0,0001	0,13
Pathomorphologie (gesamt)	0,63	0,0003	0,57
- Kopfveränderungen	0,75	0,55	0,95
- Halsveränderungen	0,061	0,15	0,48
- Schwanzveränderungen	0,46	0,0064	0,43
- aufgerollte Schwänze	0,11	0,076	0,75
- Knickschwänze	0,13	0,0015	0,82
- schleifenförmige Schwänze	0,045	0,0003	0,55
- lose Köpfe	0,96	0,0004	0,90
- Plasmatropfen	0,48	0,0059	0,22
Kopfkappenveränderungen (gesamt)	0,10	< 0,0001	0,57
- abgelöste Kopfkappen	0,08	< 0,0001	0,40
- schiefe Kopfkappen	0,55	0,012	0,16
- sonstige Veränderungen	0,087	< 0,0001	0,14

9.9 Abbildungsverzeichnis

9.10 Tabellenverzeichnis

10 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. A. Wehrend für die Überlassung des interessanten Themas und für das entgegengebrachte Vertrauen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. S. Goericke-Pesch für die gute und freundliche Betreuung während aller Phasen der Dissertation, insbesondere aber für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, für ihre unermüdlichen Hilfestellungen bei der Anfertigung dieser Arbeit, für ihre guten Ratschläge und für die vielen motivierenden Worte.

Auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen, die stets hilfsbereit waren, möchte ich danken.

Ebenso danke ich meinen Mitdoktorandinnen für die gegenseitigen Hilfen und Aufmunterungen während der vielen gemeinsamen Laborstunden.

Herrn Dr. K. Failing und Frau M. Sparenberg von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für ihre Mithilfe bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse und für die Betreuung bei statistischen Fragen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Rüdenbesitzern für die geduldige Bereitstellung ihrer Hunde ganz herzlich bedanken.

Bei meiner Freundin Jule möchte ich mich ganz besonders für ihre freundschaftliche Hilfe, für ihr immer offenes Ohr, für ihre konstruktive Kritik und für die vielen schönen gemeinsamen Stunden während der gesamten Zeit des Studiums und der Doktorarbeit bedanken.

Ebenfalls danke ich meinem Freund Beni für alles Verständnis, für das geduldige Zuhören und für die technische Unterstützung bei diversen Computerproblemen.

Auch bei allen anderen Freundinnen und Freunden, die hier aus Platzgründen keine Erwähnung fanden, möchte ich mich für ihre Unterstützung bedanken.

Zuletzt danke ich von ganzem Herzen meiner Mutter, die mir durch ihre umfassende Unterstützung in allen Bereichen meines bisherigen Weges mein Studium und diese Arbeit ermöglicht hat.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Daniela Klaus

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5924-8

9 783835 959248